

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.14.004

## 滋肾育胎丸对 DOR 大鼠模型 Bcl-2、Bax 表达的影响\*

陈思<sup>1</sup>,樊耀华<sup>1</sup>,李婧<sup>2△</sup>,赵颖<sup>2</sup>,张芝桐<sup>1</sup>,黎子莹<sup>1</sup>,陈颖慧<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学第一临床医学院,广州 510405;2. 广州中医药大学第一附属医院妇产科,广州 510405)

**[摘要]** **目的** 探讨滋肾育胎丸对雷公藤多甙诱导的卵巢储备功能下降(DOR)大鼠模型卵泡凋亡及相关蛋白表达的影响。**方法** 将40只大鼠分为对照组、模型组、补佳乐组及滋肾育胎丸低、高剂量组,每组8只。采用灌胃雷公藤多甙片建立大鼠DOR模型,HE染色检测大鼠卵巢病理,对各级卵泡进行计数,免疫组织化学法检测各组大鼠卵泡、卵巢间质的Bcl-2、Bax蛋白表达变化。**结果** 与对照组比较,模型组大、小卵泡数量减少,闭锁卵泡的数量增加,并且在各类卵泡中Bcl-2表达均降低,Bax表达均升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与模型组比较,滋肾育胎丸高、低剂量及补佳乐组大鼠的大、小卵泡数量增加,闭锁卵泡数量减少,大、小卵泡的Bcl-2表达均有明显升高,Bax表达均明显降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 滋肾育胎丸可通过上调Bcl-2蛋白和下调Bax蛋白表达,抑制卵泡过早、过快凋亡,从而起到治疗DOR的作用。

**[关键词]** 滋肾育胎丸;卵巢储备功能下降;Bcl-2;Bax;卵泡**[中图分类号]** R711.59**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)14-1853-04

## Effects of Zishen Yutai Pills on expression of Bcl-2 and Bax in rat model of diminished ovarian reserve\*

CHEN Si<sup>1</sup>, FAN Yaohua<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2△</sup>, ZHAO Ying<sup>2</sup>,  
ZHANG Zhitong<sup>1</sup>, LI Ziying<sup>1</sup>, CHEN Yinghui<sup>1</sup>

(1. First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of Zishen Yutai Pills on follicle apoptosis and related protein expression in diminished ovarian reserve(DOR) rat model induced by tripterygium glycosides. **Methods** Forty rats were divided into the control group, model group, progynova group, and Zishen Yutai Pills high and low dose groups, 8 cases in each group. Tripterygium Wilfordii Glycosides Tablets were given by gavage for establishing the rat DOR model. Then the HE staining was used to detect the pathological morphology of rat ovary. All levels of follicles were counted. Expression levels of Bcl-2 and Bax protein in follicle and ovarian stroma of each group were detected by using the immunohistochemical method. **Results** Compared to the control group, the number of great and small follicles in the model control group was decreased, number of atretic follicles was increased, Bcl-2 expression in all kinds of follicles was decreased, and Bax expression was increased, the differences were statistically significant( $P<0.05$ ). Compared to the model group, the number of great and small follicles in the Zishen Yutai Pills high and low dose groups and progynova group was increased, number of atretic follicles was decreased, the Bcl-2 expression in great and small follicles was significantly increased and the Bax expression was significantly decreased, the differences were statistically significant( $P<0.05$ ). **Conclusion** Zishen Yutai Pills can inhibit the premature and too fast follicles apoptosis by up-regulating the expression of Bcl-2 protein and down-regulating the expression of Bax protein, thus plays the effect for treating DOR.

**[Key words]** Zishen Yutai Pills; diminished ovarian reserve; Bcl-2; Bax; ovarian follicle

卵巢产生成熟卵子的数量减少,或卵泡质量下降,均将导致妇女生育能力下降及性激素失调,称为卵巢储备功能下降(diminished ovarian reserve, DOR),临床表现为月经量少、闭经、排卵障碍、不孕

等,同时临床中以血清基础卵泡雌激素(bFSH) $<40$  IU/L,结合B超及其他血清学检查评估辅助诊断DOR;若其进一步发展可导致卵巢功能衰竭,给患者的生活及工作带来巨大影响<sup>[1-4]</sup>。中医学中虽未有

\* 基金项目: 广州中医药大学大学生创新创业训练项目(201510572105);广州白云山中一药业有限公司罗元恺滋肾育胎丸中青年科研基金项目(140210)。作者简介:陈思(1994—),在读硕士研究生,主要从事中医妇科学研究。△ 通信作者,E-mail:lijing\_gzh@126.com。

DOR 的病名记录,但根据临床表现,可归于月经过少、月经后期、闭经、不孕、年未老水断等病证中。现代中医认为肾在 DOR 的发病中起到了至关重要的作用,因此在治疗上均提倡以补肾为主。滋肾育胎丸为罗元恺教授之经验方,具有补肾健脾、益气养血之功,基于“肾主生殖”的原理,抓住其补肾以调经、助孕、安胎的主线,在临床上也被用于治疗 DOR<sup>[4]</sup>,但关于其治疗机制的研究较少,因此本研究将通过探讨滋肾育胎丸对 DOR 大鼠模型的卵泡、卵泡间质 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响,探讨其治疗 DOR 的机制,为滋肾育胎丸进一步在临床上推广应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF 级 SD 大鼠 60 只,体质量 175 g 左右,由广东省医学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(粤)2013-0002。实验动物质量合格证明编号:44007200027926。对购入动物检疫 3 d,期间每天检查动物 1 次,未发现不健康动物,则全部纳入实验。观察大鼠动情周期,筛选 50 只有规律动情周期的大鼠进行下一步实验。

**1.1.2 药物与试剂** 滋肾育胎丸(批号:V0043),购自广州白云中一药业有限公司;补佳乐(批号:20150415),购自拜耳医药保健有限公司广州分公司;雷公藤多甙片(批号:20150404),购自远大医药黄石飞云制药有限公司;Bcl-2 rabbit polyclonal IgG: Santa Cruz Biotechnology, Inc. Lot No.: G2516; Bax rabbit polyclonal IgG: Santa Cruz Biotechnology, Inc. Lot No.: F3016; 羧甲基纤维素钠(批号:20150119),购自天津市大茂化学试剂厂。

**1.1.3 实验仪器** Leica TP1020 脱水机, Leica EG1140H 包埋机, Leica RM2255 切片机, Leica Autostainer XL 染色机购自徕卡显微系统(上海)贸易有限公司,奥林巴斯 IX71 倒置显微镜购自奥林巴斯(中国)有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 试剂剂量设计** 雷公藤多甙片剂量为 55 mg/kg,每天灌胃 1 次;滋肾育胎丸低剂量为 0.79 g/kg,每天灌胃 1 次;高剂量为 3.15 g/kg,每天灌胃 2 次;阳性药补佳乐剂量为 0.30 mg/kg,每天灌胃 1 次。

**1.2.2 试剂配备** (1)0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液:取 4/5 总配置量的纯净水至烧杯中,准确称量 CMC-Na,磁力搅拌器边加热边搅拌下缓慢加入烧杯中,搅拌至完全溶解,放入 2~8℃冰箱过夜,第二天定容至所需量即可。(2)雷公藤多甙片混悬液:取 70 片雷公藤多甙片,研磨粉碎后,加 4.90 g 吐温 80,搅拌均有后,加纯净水至 127 mL,搅拌溶解即可。(3)滋肾育胎丸:将滋肾育胎丸研磨后加入 0.5% CMC-Na 溶液研磨搅拌均匀,使其分别为 7.90% (m : v) 及 15.75% (m : v) 两个浓度。(4)补佳乐:将

补佳乐加入 0.5% CMC-Na 溶液研磨搅拌均匀使其浓度为 0.03 mg/mL。

**1.2.3 DOR 模型制备** 选取动情周期规律的大鼠 40 只,其中 8 只作为对照组,给予 0.10 mL/kg 的 0.5% CMC-Na 溶液灌胃,每天 1 次,连续 14 d。余下的 32 只大鼠,按 0.10 mL/kg 体质量的剂量灌胃雷公藤多甙片溶液制作 DOR 模型,每天 1 次,连续 14 d。自灌胃造模后第 4~14 天,每天进行阴道涂片,观察动情周期。

**1.2.4 分组及给药** 将 DOR 模型制作成功的动情周期紊乱大鼠 32 只,随机分为模型组、补佳乐组及滋肾育胎丸低、高剂量组(低、高剂量治疗组),每组 8 只。补佳乐组按 0.10 mL/kg 体质量灌胃补佳乐溶液作为阳性对照;低、高剂量治疗组按 0.10 mL/kg 体质量灌胃相应浓度的滋肾育胎丸溶液,低剂量治疗组 1 次/天,高剂量治疗组 2 次/天;模型组和对照组给予等量的 0.5% CMC-Na 溶液,1 次/天,连续 35 d。

**1.2.5 卵巢内卵泡计数** 末次给药 24 h 内,取大鼠的卵巢组织,进行石蜡包埋,切片。病理切片为连续 5  $\mu$ m 切片,每间隔 9 张取 1 张切片进行 HE 染色,观察卵巢组织变化并计算各类卵泡数。观察 1 个卵巢,卵泡中见卵丘、卵泡腔者称为大卵泡(窦状卵泡或成熟卵泡),卵泡中未见卵丘及明显卵泡腔者称为小卵泡(窦前卵泡或始基卵泡),卵泡的形态不规则,卵母细胞表现为核偏位、固缩、透明带塌陷,颗粒细胞及卵泡膜细胞松散、萎缩并脱落入卵泡腔称为卵泡闭锁。累积计算可得大卵泡、小卵泡及闭锁卵泡的数量。

**1.2.6 卵巢 Bcl-2、Bax 蛋白表达的检测** 采用免疫组织化学法检测各组大鼠卵巢组织 Bcl-2、Bax 蛋白的表达。经抗原修复(微波法)、封闭内源性过氧化物酶、血清封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显色、苏木素复染、脱水透明、封片。置于普通显微镜 400 倍数下观察拍片,每个标本挑选大、小、闭锁卵泡及卵巢间质各 3 个区域进行拍片。运用 Image-Pro Plus 5.1 图像处理系统,对图片进行分析,测定并记录每张图片的平均面积、平均光密度值,计算出累积光密度值(IOD)。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS21.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,数据方差齐或数据经转换后方差齐,采用组间两两比较的单因素方差分析;若数据经转换后方差仍不齐,则采用秩和检验进行统计分析。检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠卵巢组织形态比较** 对照组大鼠卵巢皮质部有数个卵泡,处于不同发育阶段,以小卵泡为主;原始卵泡位于皮质深层,间质未见炎性细胞浸润。模型组大鼠卵巢萎缩,卵泡数量较少,卵巢皮质部有数个卵泡,处于不同发育阶段,以闭锁卵泡为主,卵泡

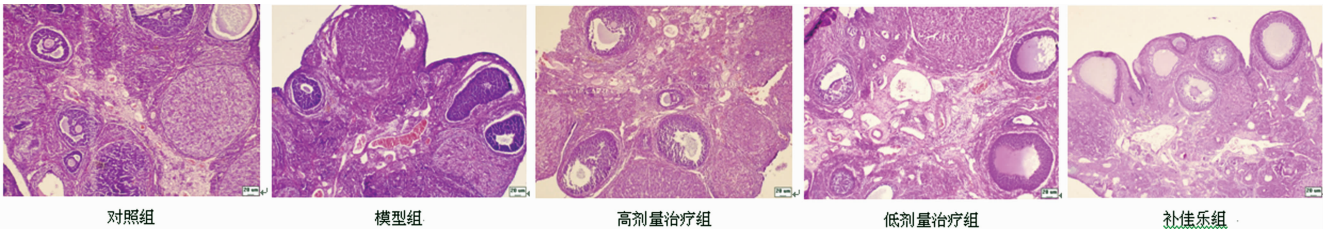


图1 各组大鼠卵巢组织病理形态(×100)

颗粒细胞层次减少,间隙增大;间质见不同程度的炎性细胞浸润。高剂量治疗组大鼠卵巢较对照组小,卵巢皮质部有数个卵泡,数量较对照组少,处于不同发育阶段,以小卵泡为主;间质见少量炎性细胞浸润。低剂量治疗组大鼠卵巢较对照组小,卵巢皮质部有数个卵泡,处于不同发育阶段,数量较对照组少,以小卵泡为主;卵泡颗粒细胞层次减少,间隙增大;间质见少量炎性细胞浸润。补佳乐组大鼠卵巢较对照组小,卵巢皮质部有数个卵泡,处于不同发育阶段,以小卵泡为主,间质未见炎性细胞浸润。各组大鼠卵巢组织病理形态,见图1。

**2.2 各组大鼠卵巢卵泡计数比较** 与对照组比较,模型组大鼠小卵泡、大卵泡数量减少,且其闭锁卵泡数量增加,差异均有统计学意义( $P<0.01$ );高剂量治疗组大鼠小卵泡、大卵泡数量及闭锁卵泡数量与对照组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );低剂量治疗组、补佳乐组的小卵泡数量明显低于对照组( $P<0.05$ ),大卵泡数量及闭锁卵泡数量与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比较,高剂量治疗组、低剂量治疗组、补佳乐组的小卵泡、大卵泡均明显增加,闭锁卵泡数量明显减少,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表1。

**2.3 各组大鼠卵巢 Bcl-2 蛋白表达水平比较** 与对照组比较,模型组大鼠的大卵泡、小卵泡及闭锁卵泡的 Bcl-2 蛋白表达均降低( $P<0.05$ ),卵巢间质的 Bcl-

2 表达也略有降低,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比较,高剂量组治疗、低剂量治疗组、补佳乐组的大卵泡及小卵泡的 Bcl-2 蛋白表达均明显升高( $P<0.05$ ),闭锁卵泡和卵巢间质的 Bcl-2 表达也略有升高,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。低、高剂量治疗组大鼠大卵泡及小卵泡的 Bcl-2 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表2。

表1 各组大鼠卵巢卵泡计数比较( $\bar{x}\pm s,n=8$ )

| 组别     | 小卵泡                      | 大卵泡                     | 闭锁卵泡                   |
|--------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| 对照组    | 20.50±1.22 <sup>a</sup>  | 18.38±2.45 <sup>a</sup> | 6.88±1.45 <sup>a</sup> |
| 模型组    | 13.13±1.36               | 10.63±2.34              | 17.25±2.90             |
| 高剂量治疗组 | 19.00±4.06 <sup>a</sup>  | 17.13±4.51 <sup>a</sup> | 8.63±2.18 <sup>a</sup> |
| 低剂量治疗组 | 17.75±3.46 <sup>ac</sup> | 16.13±3.14 <sup>b</sup> | 9.25±2.63 <sup>a</sup> |
| 补佳乐组   | 17.88±3.02 <sup>ac</sup> | 17.25±3.99 <sup>a</sup> | 8.75±2.33 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与模型组比较;<sup>c</sup>: $P<0.05$ ,与对照组比较

**2.4 各组大鼠卵巢 Bax 蛋白表达水平比较** 与对照组比较,模型组的大卵泡、小卵泡及闭锁卵泡中的 Bax 表达水平均明显上升( $P<0.05$ ),卵巢间质的 Bax 表达水平也略有上升,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比较,高剂量治疗组、低剂量治疗组、补佳乐组大鼠的大卵泡、小卵泡及闭锁卵泡 Bax 表达水平有明显降低( $P<0.05$ ),卵巢间质中的 Bax 表达水平也略有降低,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表3。

表2 各组大鼠卵巢 Bcl-2 蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s,n=8$ )

| 组别     | 大卵泡                          | 小卵泡                          | 闭锁卵泡                         | 卵巢间质            |
|--------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| 对照组    | 0.045 3±0.005 4 <sup>a</sup> | 0.029 2±0.005 8 <sup>a</sup> | 0.026 7±0.005 9 <sup>a</sup> | 0.005 2±0.003 7 |
| 模型组    | 0.024 7±0.006 3              | 0.018 6±0.006 9              | 0.017 3±0.005 5              | 0.005 1±0.002 1 |
| 高剂量治疗组 | 0.036 1±0.007 3 <sup>a</sup> | 0.028 0±0.007 0 <sup>a</sup> | 0.021 8±0.006 6              | 0.005 7±0.002 0 |
| 低剂量治疗组 | 0.040 3±0.009 7 <sup>a</sup> | 0.027 2±0.009 5 <sup>a</sup> | 0.021 5±0.005 4              | 0.005 3±0.002 6 |
| 补佳乐组   | 0.041 6±0.011 9 <sup>a</sup> | 0.028 6±0.001 0 <sup>a</sup> | 0.020 2±0.008 8              | 0.005 2±0.002 9 |

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与模型组比较

表3 各组大鼠卵巢 Bax 蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s,n=8$ )

| 组别     | 大卵泡                          | 小卵泡                          | 闭锁卵泡                         | 卵巢间质            |
|--------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| 对照组    | 0.013 5±0.004 7 <sup>a</sup> | 0.013 5±0.006 2 <sup>a</sup> | 0.040 3±0.009 4 <sup>a</sup> | 0.001 2±0.002 1 |
| 模型组    | 0.024 9±0.004 8              | 0.026 2±0.011 4              | 0.058 8±0.010 3              | 0.002 3±0.002 6 |
| 高剂量治疗组 | 0.017 6±0.003 8 <sup>a</sup> | 0.015 6±0.007 9 <sup>a</sup> | 0.046 2±0.010 6 <sup>a</sup> | 0.000 5±0.000 4 |
| 低剂量治疗组 | 0.015 8±0.007 8 <sup>a</sup> | 0.018 2±0.004 9 <sup>a</sup> | 0.047 2±0.009 7 <sup>a</sup> | 0.001 8±0.001 3 |
| 补佳乐组   | 0.017 4±0.007 6 <sup>a</sup> | 0.015 4±0.007 5 <sup>a</sup> | 0.044 2±0.014 4 <sup>a</sup> | 0.000 6±0.000 5 |

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与模型组比较

### 3 讨 论

流行病学研究发现,DOR 在人群中的发生率约为 10%,一般需要 1~6 年发展为卵巢早衰(POF),严重影响女性的身心健康<sup>[1-2]</sup>。由于 DOR 的发病是多因素综合作用的结果,其具体发病机制尚不明确,因此临床上亟须发现更有效、不良反应小的治疗方法改善卵巢储备功能,提高女性的生育能力,调节女性的性激素水平。中医学认为肾在 DOR 中起到了至关重要的作用<sup>[5-6]</sup>。《素问·上古天真论》曰:“女子……二七天癸至,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。”阐释了肾藏精气为化血之源,为妇女的月事、胎孕提供物质基础。因此肾中精气是否充足,直接影响到妇女经血及胎产情况。适孕妇女出现卵巢功能低下等不孕的症状,也须从肾之精气亏虚来考虑。

滋肾育胎丸是全国著名中医学家罗元恺的经验方,由广州白云中一药业集团生产,由党参、白术、巴戟天、何首乌、杜仲、续断、菟丝子、熟地黄等组成,具有补肾健脾、益气培元、养血安胎的功能,基于“肾主生殖”的原理,岭南罗氏妇科流派抓住以补肾调经、助孕、安胎的主线,在临床上不仅应用自然流产的防治,也用于月经不调、不孕症、未破裂卵泡黄素化综合征、卵巢损伤、先兆流产等治疗,提高体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的成功率,以及用于 POF 和 DOR 的治疗<sup>[7-11]</sup>。

正常的细胞凋亡在机体生长发育及维持内环境稳定等方面发挥重要作用,凋亡过度或不足均会导致不同类型的疾病。Bcl-2 是 B 细胞滤泡性淋巴瘤染色体断裂点发现的凋亡抑制基因。而 Bax 则是 Bcl-2 家族中研究最为广泛的促凋亡基因,在凋亡过程中起着枢纽作用<sup>[6]</sup>。女性从胎儿至青春期,卵母细胞不断减少,在此过程中,大量卵泡发生凋亡,以确保最终有适量优质卵泡维护卵巢功能<sup>[12]</sup>,目前发现尤其是 Bcl-2 和 Bax 的表达对卵泡在生长发育有重要作用。卵泡在生长发育过程中的大量丢失与 Bax 的持续表达相关,而当卵泡需要进一步增殖时,Bcl-2 选择性表达,可与 Bax 互相调节,使卵巢储备维持在合理水平<sup>[13-15]</sup>。然而,当 Bcl-2 与 Bax 表达失调时,在发育过程中的卵泡开始凋亡,形成闭锁卵泡,最终导致 DOR<sup>[16]</sup>。

本研究发现,与对照组比较,模型组的大卵泡、小卵泡计数下降,闭锁卵泡数量增加,各类卵泡的 Bcl-2 表达降低,Bax 表达上升,提示雷公藤多甙可影响卵巢各类卵泡 Bcl-2 及 Bax 的表达,一方面导致小卵泡(窦前卵泡或始基卵泡)不能发育为大卵泡(窦状卵泡或成熟卵泡)或诱导小卵泡形成闭锁卵泡,成熟卵泡数量下降;另一方面导致大卵泡凋亡加速,成熟卵泡质量下降,共同促进 DOR 的发生与发展。与模型组

比较,高剂量治疗组、低剂量治疗组、补佳乐组大鼠的大卵泡、小卵泡数量明显增加( $P<0.05$ ),闭锁卵泡数量明显减少( $P<0.01$ ),且使大、小卵泡的 Bcl-2 表达水平均明显升高( $P<0.05$ ),Bax 表达水平均明显下降( $P<0.05$ )。提示滋肾育胎丸可通过上调 Bcl-2 表达水平,下调 Bax 表达水平,从而促进 DOR 模型大鼠的卵巢卵泡发育生长。但与模型组比较,高剂量治疗组、低剂量治疗组、补佳乐组的闭锁卵泡 Bcl-2 表达均增加,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而其 Bax 表达均下降,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。提示滋肾育胎丸可能通过调控 Bcl-2 家族其他抑制凋亡的基因作用于闭锁卵泡,需进一步研究探讨。

在滋肾育胎丸治疗中,高剂量治疗组大鼠的大卵泡、小卵泡计数增加明显。但在大卵泡、小卵泡的 Bcl-2 及 Bax 表达水平中,高、低剂量无明显线性关系,其原因可在日后的研究中进一步探究,可能与滋肾育胎丸的有效浓度相关。在高剂量治疗组、低剂量治疗组、补佳乐组中,补佳乐组的小卵泡 Bcl-2 表达水平最高,Bax 表达水平最低;但在卵泡计数方面,高剂量治疗组的小卵泡计数最高,闭锁卵泡计数最少,这提示滋肾育胎丸除通过调节 Bcl-2、Bax 表达水平外,还可通过其他治疗机制多靶点、高效性地治疗 DOR,有待进一步研究阐明。

综上所述,滋肾育胎丸使 DOR 模型大鼠 Bcl-2 表达水平上升,Bax 表达水平下降,抑制卵泡过早、过快地凋亡,促进卵巢中的卵泡生长发育,恢复卵巢各类卵泡数量,从而改善卵巢储备功能,该过程是其治疗 DOR 的机制之一。因此,滋肾育胎丸是治疗 DOR 具有良好前景的药物,需深入研究其治疗 DOR 的机制,有利于其在临床上进一步推广,为 DOR 的防治奠定有效的基础。

### 参考文献

- [1] MAHESHWARI A, FOWLER P, BHATTACHARYA S. Assessment of ovarian reserve—should we perform tests of ovarian reserve routinely? [J]. Hum Reprod, 2006,21(11):2729-2735.
- [2] 韩玉芬,程淑蕊,敬文娜,等. 卵巢储备功能下降的预测及治疗[J]. 中国计划生育学杂志,2007,15(2):117.
- [3] 陈文俊,李慧芳,周蓓蓓,等. 卵巢储备功能低下评估及治疗方法研究进展[J]. 实用医学杂志,2016,32(1):19-22.
- [4] 韩莹,张云山. 卵巢储备功能检测的研究进展[J]. 实用医学杂志,2015,31(4):523-525.
- [5] 许小凤,谈勇. 卵巢储备功能低下中医证治路径探析[J]. 环球中医药,2010,3(5):325-327.
- [6] 陈思,樊耀华,李婧,等. 从肾论治卵巢储备功能低下之探析[J]. 中国中医药现代远程教育,2016,14(14):58-60.
- [7] 赵颖,曹蕾,罗颂平. 滋肾育胎丸的临床应用与研究[J]. 世界中医药,2011,6(4):318-319.
- [8] 吴丽敏,韩辉,胡美红,等. 黄体期添加滋肾育胎丸对体外受精-胚胎移植周期胚胎着床和妊娠结(下转第 1861 页)

- ing confers neuroprotection via anti-inflammatory effects [J]. *Front Biosci*(Elite Ed), 2011, 3(2): 604-615.
- [3] SIGAUT S, JANNIER V, ROUELLE D, et al. The preconditioning effect of sevoflurane on the Oxygen glucose-deprived hippocampal slice: the role of tyrosine kinases and duration of ischemia [J]. *Anesth Analg*, 2009, 108(2): 601-608.
- [4] SZYDLOWSKA K, TYMIANSKI M C. Ischemia and excitotoxicity [J]. *Cell Calcium*, 2010, 47(2): 122-129.
- [5] JIANG H, TIAN S L, ZENG Y, et al. TrkA pathway(s) is involved in regulation of TRPM7 expression in hippocampal neurons subjected to ischemic-reperfusion and oxygen-glucose deprivation [J]. *Brain Res Bull*, 2008, 76(1/2): 124-130.
- [6] CLAPHAM D E. TRP channels as cellular sensors [J]. *Nature*, 2003, 426(6966): 517-524.
- [7] AARTS M M, TYMIANSKI M. TRPM7 and ischemic CNS injury [J]. *Neuroscientist*, 2005, 11(2): 116-123.
- [8] BAE CY, SUN H S. TRPM7 in cerebral ischemia and potential target for drug development in stroke [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(6): 725-733.
- [9] GE Q F, HU X, MA Z Q, et al. Baicalin attenuates oxygen-glucose deprivation-induced injury via inhibiting NMDA receptor-mediated 5-lipoxygenase activation in rat cortical neurons [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(2): 148-157.
- [10] 邵建林, 万晓红, 王雁, 等. HO-1 在七氟烷预处理抑制大鼠氧糖剥夺海马神经元凋亡中的作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2010, 30(4): 484-487.
- [11] 邵建林, 万晓红, 曾卫军, 等. 血红素加氧酶-1 对氧糖剥夺海马神经元 CDK5-ATM-P53 信号转导通路的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(6): 732-735.
- [12] LIU D, ZHANG H, GU W J, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rb1 on high Glucose-Induced neurotoxicity in primary cultured rat hippocampal neurons [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79399.
- [13] DOU Y L, LI Y, CHEN J K, et al. Inhibition of cancer cell proliferation by midazolam by targeting transient receptor potential melastatin 7 [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(3): 1010-1016.
- [14] MAGIERA M M, MORA S, MOJSA B, et al. Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(2): 281-292.
- [15] 施庆余, 罗爱林, 李世勇. 异氟烷对发育期大鼠海马 IL-1 $\beta$  mRNA, IL-6 mRNA 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2010, 30(3): 324-326.
- [16] TOUYZ R M, HE Y, MONTEZANO A C, et al. Differential regulation of transient receptor potential melastatin 6 and 7 cation channels by ANG II in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 290(1): 73-78.
- [17] HIROSE K, OKAJIMA K, TAOKA Y, et al. Activated protein C reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation [J]. *Ann Surg*, 2000, 232(2): 272-280.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] KITANO H, KIRSCH J R, HURN P D, et al. Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain [J]. *J Cerebral Blood Flow Metabol*, 2007, 27(6): 1108-1128.
- [20] WANG J K, YU L N, ZHANG F J, et al. Postconditioning with sevoflurane protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury via PI3K/Akt pathway [J]. *Brain Res*, 2010, 1357(1): 142-151.
- [21] OBAL D, DETTWILER S, FAVOCCIA C, et al. The influence of mitochondrial K-ATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo [J]. *Anesth Analg*, 2005, 101(5): 1252-1260.
- [22] SUN H S, JACKSON M F, MARTIN L J, et al. Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia [J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12(10): 1300-1307.

(收稿日期: 2017-08-22 修回日期: 2018-01-25)

(上接第 1856 页)

- 局的影响 [J]. *中医药临床杂志*, 2016, 28(2): 209-212.
- [9] 邹琦, 黄秋凌, 崇立明, 等. 滋肾育胎丸对 SD 大鼠胚胎-胎仔发育的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(3): 330-336.
- [10] 周征, 王欣, 舒荣梅. 滋肾育胎丸治疗先兆流产 56 例疗效观察 [J]. *中医药导报*, 2012, 18(1): 41-43.
- [11] 刘云肖, 马惠荣, 陈景伟, 等. 滋肾育胎丸对电磁辐射大鼠卵巢组织氧化损伤和 Nrf2 蛋白表达的影响 [J]. *中国药房*, 2016, 27(4): 470-473.
- [12] 王汝冰, 周珊珊, 周文, 等. 抗凋亡因子 Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> 蛋白小分子抑制剂研究进展 [J]. *中国药物化学杂志*, 2011, 21(2): 155-164.
- [13] ALBAMONTE M I, ALBAMONTE M S, STELLA I, et al. The infant and pubertal human ovary: Balbiani's body-associated VASA expression, immunohistochemical detection of apoptosis-related BCL2 and BAX proteins, and DNA fragmentation [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(3): 678-706.
- [14] 李敏, 林俊. 细胞凋亡途径及其机制 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41(2): 103-107.
- [15] 蔺会兰, 孙晓慧, 刘俊霞, 等. Bcl-2 与卵巢颗粒细胞凋亡相关性研究 [J]. *河北医药*, 2015, 37(9): 1316-1319.
- [16] 李婷婷, 连方, 孙振高. 卵巢颗粒细胞凋亡的分子机制及中医相关研究进展 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(12): 1524-1527.

(收稿日期: 2017-08-21 修回日期: 2018-01-24)