

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.13.005

网络首发 http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20190420.1513.004.html(2019-4-22)

环磷酰胺建立 SD 大鼠卵巢功能减退模型的研究*

李丽美¹,陶莉莉²,和秀魁^{3△},陈小平⁴,孙冬梅⁴,陈玉兴⁴,夏建红¹

(1. 广东省妇幼保健院妇保科,广州 510095;2. 广州中医药大学第一附属医院妇科,广州 510405;

3. 广东省妇幼保健院妇科,广州 510095;4. 广东省中医药工程技术研究院,广州 510095)

[摘要] **目的** 利用环磷酰胺(CTX)建立 SD 成年雌性大鼠卵巢功能减退(DOR)模型。**方法** 取健康 SPF 级成年雌性 SD 大鼠 120 只,分为 G1 组(生理盐水组)和 G2 组(CTX 组),每组 60 只。G2 组大鼠予 CTX 75 mg/kg 腹腔单次注射造模,G1 组予 0.9% 生理盐水 1 mL 单次腹腔注射。于造模后的第 1、2、3、4、6、8 周,断颈处死处于动情间期的大鼠各 10 只。观察大鼠一般情况、动情周期、卵巢指数,血清雌二醇(E2)、促卵泡激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、抗苗勒氏激素(AMH)、抑制素 B(INHB)水平,以及卵巢病理结构。**结果** 造模后 G2 组较 G1 组,动情周期与间期延长,卵巢皮质纤维化增生,髓质萎缩,原始卵泡减少,颗粒细胞减少,血管壁增厚,卵巢指数、E2、AMH、INHB 明显降低($P<0.05$),FSH、LH 明显升高($P<0.05$)。**结论** 采用 75 mg/kg CTX 单次腹腔注射能成功建立 SD 大鼠 DOR 模型,该方法操作简便易行、造模时间短、成功率高,值得推广应用。

[关键词] 原发性卵巢功能不全;环磷酰胺;卵巢功能试验

[中图分类号] R711.59 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)13-2180-04

Study on cyclophosphamide for constructing SD rat diminished ovarian reserve model*

LI Limei¹,TAO Lili²,HE Xiukui^{3△},CHEN Xiaoping⁴,SUN Dongmei⁴,CHEN Yuxing⁴,XIA Jianhong¹

(1. Department of Women Healthcare,Guangdong Maternal and Child

Healthcare Hospital,Guangzhou,Guangdong 510095,China;2. Department of Gynecology,the First

Affiliated Hospital of Guangdong University of Traditional Chinese Medicine,Guangzhou,

Guangdong 510405,China;3. Department of Gynecology,Guangdong Maternal and Child

Healthcare Hospital,Guangzhou,Guangdong 510095,China;4. Guangdong Research Institute of

Traditional Chinese Medicine Engineering Technology,Guangzhou,Guangdong 510095,China)

[Abstract] **Objective** To investigate to construct adult female SD rat diminished ovarian reserve (DOR) model using cyclophosphamide (CTX). **Methods** One hundred and twenty healthy SPF grade adult female SD rats were divided into the group 1(G1,the physiological saline group) and group 2 (G2,the CTX group),60 cases in each group. The rats in the G2 group were intraperitoneally injected by 75 mg/kg CTX once,and the rats in the G2 group were intraperitoneally injected by 0.9% NaCl once. Ten rats during the diestrous period in each group were sacrificed by braking the neck at 1,2,3,4,6,8 weeks after modeling. The general situation, diestrous period,ovarian index,levels of serum FSH,LH,E2,AMH and INHB,and ovarian pathological structure were observed. **Results** After modeling,the estrous cycle and interval in the G2 group were extended compared with the G1 group,ovarian cortex fibrosis hyperplasia,medullar atrophy,primitive follicles decreased,granular cells decreased,vascular wall thickening,and ovarian index,serum E2,AMH and INHB levels significantly reduced ($P<0.05$),while the serum FSH and LH levels significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Constructing SD rat DOR model by single intraperitoneal injection of 75mg/kg CTX is successful. This method is simple to operate and convenient with short modeling time and high success rate,which is worthy of promotionand application.

[Key words] primary ovarian insufficiency;cyclophosphamide;ovarian function tests

* 基金项目:2019 年广东省中医药局中医药科研项目(20194003,20193004)。 作者简介:李丽美(1985—),主治医师,博士,主要从事妇科

内分泌疾病和中医妇科研究。 △ 通信作者,E-mail:372266894@qq.com。

卵巢功能减退(DOR)是一种临床表现多样、病因复杂且进行性发展的疾病。它指既往正常的卵巢产生卵子的能力减弱,卵泡的质量下降。引起DOR的病因很多,化疗是目前已经明确的病因。环磷酰胺(CTX)是引起卵巢功能损害最大的化疗药物之一。临床上长期周期性使用CTX,可引起月经不调、闭经、早发性卵巢功能不全(POI)或卵巢早衰(POF),停药后一段时间月经可恢复,恢复的时间与用药剂量和化疗的时间有关。本研究采用适当剂量的CTX建立SD雌性大鼠DOR模型,以供实验研究使用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物 SPF级Spragne-Dawley(SD)成年大鼠,雌性,鼠龄12周,体质量(230 ± 10)g,由广东省医学实验动物中心提供,实验设施合格证号和动物合格证号分别为SCXK(粤)2013-0002和NO.44007200002182。本实验SPF级动物实验室设施使用许可证号:SYXK(粤)2010-0059。

1.1.2 实验仪器 JJ2000动物电子秤,BS224S万分之一电子天平,Bio-RAD 680酶标仪,YD62型石蜡包埋机,Leica RM2235轮式切片机,Leica TP 1020型全自动脱水机,YD-AB型摊烘烤片机,YD-6L型智能冰冻包埋机,Shandon Gemini染色机,DHG-9203型电热恒温干燥鼓风干燥箱,Olympus DP2-BSW型病理图像采集系统,702超低温冰箱。

1.1.3 实验药物 注射用CTX(每支0.2g,购自山西普德药业有限公司,批号04130301)。0.9%生理盐水,每支10mL。雌二醇(E2)ELISA试剂盒(批号1306246),促卵泡激素(FSH)ELISA试剂盒(批号1306251),促黄体生成素(LH)ELISA试剂盒(批号1304252),抗苗勒氏激素(AMH)ELISA试剂盒(批号1304171),抑制素B(INHB)ELISA试剂盒(批号1304261),均购自上海西唐生物科技有限公司。

1.2 方法 给予大鼠标准光照(14h光照,10h黑夜),全价颗粒饲料喂养,自由摄食,室温 $20 \sim 25$ ℃,相对湿度45%~55%。适应性喂养7d,行阴道脱落细胞涂片观察其性周期变化,选取动情周期为4~5d的大鼠120只开展实验。将动物分为G1组(生理盐水组,即空白对照组)和G2组,每组60只。参照刘惠芬等^[1]的方法对G2组大鼠予CTX腹腔单次注射造模(按CTX75mg/kg的剂量加0.9%生理盐水配成1mLCTX药液),G1组予0.9%生理盐水1mL单次腹腔注射。两组于腹腔注射造模后的第1、2、3、4、6、8周,断颈处死处于动情间期的大鼠各10只。

1.3 观察指标 一般情况:每周观察大鼠体质量、精神、饮食、皮毛、排便及活动情况。动情周期:每天08:

30取自制细棉签蘸取0.9%生理盐水后,轻轻在大鼠阴道内旋转1周,行阴道涂片,用95%乙醇固定5min,在显微镜下观察细胞的种类和形态^[2]。激素及细胞因子检测:腹主动脉取血,静置30min后,3000r/min离心10min,分离血清置于-80℃保存待测。以双抗体夹心ELISA法测定大鼠血清中FSH、LH、E2、AMH、INHB水平,实验步骤严格按试剂盒操作。卵巢指数:完整取出大鼠双侧卵巢,去掉筋膜及脂肪组织,电子天平称质量,将称得的卵巢湿重分别除以体质量,卵巢指数=卵巢湿重(mg)/体质量(g) $\times 100\%$ 。卵巢组织形态结构观察:称质量后左侧卵巢置于甲醛固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片,行组织形态学观察。病理切片为连续5 μ m切片,每间隔9张取1张切片(即第10张),HE染色^[1]。

1.4 统计学处理 采用SPSS19.0统计软件进行分析。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(One-Way ANOVA);组间两两比较方差齐时采用SNK法,方差不齐时采用Dunnett's T3法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 两组大鼠观察期间全部存活。G1组大鼠外观体征、行为活动、精神状态、摄食、饮水、被毛、呼吸、口、眼、鼻、耳、大小便形状颜色等均正常。G2组大鼠给药后出现被毛疏松、活动减少、精神不振、四肢无力等,第6、8周可恢复正常。

2.2 动情周期 G1组大鼠阴道涂片均有规则的动情周期变化,周期4~5d,中位数4.5d,动情间期1.5~2.5d,中位数2d。G2组大鼠在CTX造模后第1、2、3、4周阴道涂片显示动情周期发生改变,规则的动情周期变化消失,延长7~16d,中位数11d。阴道涂片显示分泌物少,有较多散在的白细胞,少量上皮细胞,部分有少量的角化细胞和有核细胞,动情间期5~7d,中位数6d。造模后第6周基本恢复正常的动情周期。

2.3 卵巢指数 与G1组比较,G2组大鼠卵巢指数在造模后第1、2、3、4、6周明显降低($P < 0.01$),第8周无差异($P > 0.05$)。G2组造模后第3、4、6周较第1周明显降低($P < 0.05$),第8周较第1周无明显变化($P > 0.05$),见表1。

2.4 卵巢组织 显微镜下G1组大鼠卵巢可清楚地分为皮质和髓质两部分,皮质结构清晰,各级卵泡及黄体的形态和结构均完整,间质腺少见,血管丰富,未发现间质炎症变化及纤维化等病变;髓质充盈,含有丰富的神经、淋巴管和较多的血管,未见充血、变性坏死等异常改变。G2组大鼠造模后从1周开始可见卵巢髓质部分萎缩,皮质明显增生且纤维化样变,颗

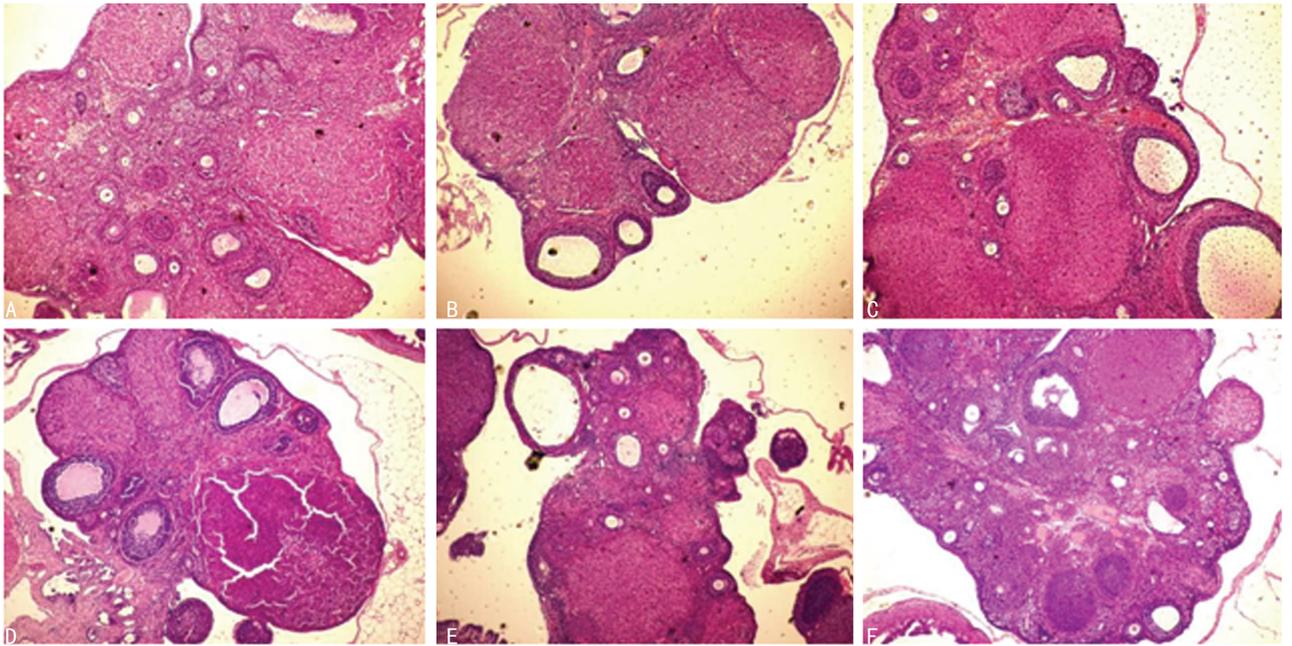
粒细胞层数减少,排列疏松,甚至空泡,原始卵泡、成熟卵泡数减少,初级卵泡、次级卵泡、闭锁卵泡增加。血管壁增厚,玻璃样变,内膜纤维化,肌层增厚,部分血管腔狭窄甚至消失。从第 4 周开始,卵巢形态开始恢复,第 8 周卵巢形态部分恢复,原始卵泡减少,见图 1。

2.5 血清 FSH、LH、E₂、AMH、INHB 水平 与 G1 组比较,G2 组大鼠 FSH 在造模后第 1、2、3、4、6、8 周明显升高($P<0.01$);G2 组大鼠造模后第 4、6、8 周与第 1 周比较明显降低($P<0.05$),见表 2。与 G1 组比较,G2 组大鼠 LH 在造模后第 1、2、3、4、6 周明显升

高($P<0.01$),第 8 周无明显变化($P>0.05$),见表 3。G2 组大鼠 E₂ 在造模后第 1、2、3、4、6、8 周较 G1 组明显降低($P<0.01$);G2 组大鼠造模后第 4、6、8 周与第 1 周比较明显升高($P<0.05$),见表 4。与 G1 组比较,G2 组大鼠血清 AMH 在造模后第 1、2、3、4、6、8 周明显降低($P<0.01$);G2 组大鼠造模后第 3、4、6、8 周与第 1 周比较明显升高($P<0.05$),见表 5。G2 组大鼠 INHB 在造模后第 1、2、3、4、6、8 周较 G1 组明显降低($P<0.01$);G2 组大鼠造模后第 6、8 周与第 1 周比较明显升高($P<0.05$),见表 6。

表 1 两组大鼠卵巢指数的情况($\bar{x}\pm s, n=10, \%$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周
G1 组	50.44±2.52	49.79±3.75	49.31±3.51	49.65±3.07	49.62±2.68	49.45±4.59
G2 组	46.56±1.94	44.98±2.95	42.88±2.34	43.98±2.55	43.79±2.94	44.52±1.08



A:G1 组第 1 周;B:G2 组第 1 周;C:G2 组第 2 周;D:G2 组第 3 周;E:G2 组第 4 周;F:G2 组第 8 周

图 1 不同时间卵巢组织 HE 染色($\times 40$)

表 2 两组大鼠血清中 FSH 水平($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周
G1 组	2.80±1.17	2.77±1.14	2.09±0.63	2.08±0.76	2.13±0.89	2.06±1.04
G2 组	6.03±1.73	5.86±1.50	4.98±1.05	4.54±0.83	3.83±1.68	3.42±1.23

表 3 两组大鼠血清中 LH 水平($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周
G1 组	4.41±1.32	4.87±0.81	4.30±2.31	4.55±1.88	4.47±1.56	4.47±1.44
G2 组	7.53±1.77	7.83±0.71	7.99±2.46	6.94±2.06	6.25±1.00	5.75±1.25

表 4 两组大鼠血清中 E2 水平($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周
G1 组	63.32±7.45	63.53±11.48	64.90±11.56	60.38±7.84	64.53±13.38	67.02±11.70
G2 组	34.13±5.24	31.20±7.22	36.60±9.01	41.47±8.08	44.15±6.38	49.62±9.09

表 5 两组大鼠血清中 AMH 水平($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周
G1 组	16.75±1.80	17.50±1.17	17.88±1.47	17.32±1.96	17.73±1.22	17.32±1.87
G2 组	8.78±1.12	9.87±1.72	10.70±1.82	12.05±2.69	12.79±1.47	13.34±1.59

表 6 两组大鼠血清中 INHB 水平($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周
G1 组	148.11±18.67	136.75±27.78	147.25±17.64	150.54±19.05	155.25±14.10	153.04±18.81
G2 组	86.79±21.30	87.89±17.97	86.29±22.33	92.04±18.88	107.93±15.20	112.98±18.56

3 讨 论

POI 是女性在 40 岁之前卵巢衰退的临床综合征,以月经紊乱(如停经或稀发月经)伴有高促性腺激素和低雌激素为特征^[3],POI 是 DOR 进一步发展的结果。DOR 发病的危险因素包括晚生育(年龄大于 35 岁)、早绝经家族史、染色体异常、FMR1 基因前突变携带者、患有卵巢损伤性疾病(如子宫内膜异位症、盆腔炎炎等)或手术史、放化疗史、有吸烟嗜好等^[4-5]。使用具有生殖毒性的化疗药物是引起 DOR、POI、POF 的一个明确病因。化疗制剂对卵巢功能的影响取决于它破坏细胞的速度和能力,最早损害的是生长卵泡的颗粒细胞和卵泡膜细胞。一些化疗剂特别是烷基类可以通过损害 DNA 来杀伤细胞,甚至是不处于增殖状态的原始卵泡^[5]。人体内 DNA 修复基因随着年龄的增长而逐渐下调表达,化疗药物还可引起这些修复基因发生突变,明显增加化疗药物对卵泡的损伤作用而引起 DOR^[6]。

CTX 是影响卵巢功能最大的化疗药物之一。它属于细胞周期非特异性药物,作用于细胞 DNA 而引起 DNA 单链或双链的断裂,导致 DNA、RNA 和蛋白质的合成受到抑制而使卵巢功能损伤。长时间使用高剂量 CTX,容易引发永久性卵巢损伤,继而导致卵巢衰竭^[7]。研究认为:CTX 可破坏卵巢生长卵泡的颗粒细胞,使 E2 分泌减少,反馈引起 FSH、LH 升高^[1],另外 CTX 可使 AMH、INHB 表达降低,促进原始卵泡的“起始募集”,使原始卵泡向窦前卵泡发育,最终走向闭锁^[8-9]。研究还表明,CTX 能同时作用于原始卵泡的卵母细胞和前颗粒细胞,干扰卵泡的成熟,耗尽原始卵泡,使卵泡损伤^[10]。

DOR 属于 POI、POF 的前期状态,病情相对较

轻,尽早治疗,卵巢功能尚有机会恢复正常。POF 属于卵巢衰竭终末期,卵巢功能基本不能逆转。因此制造 DOR 动物模型要求大鼠卵巢功能有一定的损害,但又不能损害太严重。有学者^[1]采用 75 mg/kg CTX 单次腹腔注射制造大鼠卵巢功能损害模型,发现用药后 3 d、1 周、2 周卵巢功能均受到一定损害,原始卵泡数目减少,引起卵巢储备功能下降。CTX 75 mg/kg 单次腹腔注射建立卵巢功能损害的大鼠模型成本低,手术操作简便,建模成功率高,但未对 AMH、INHB、LH 等指标进行检测。陈小平^[11]复制了这一动物模型,发现用 CTX 75 mg/kg 单次腹腔注射造模后 1、2、3、4 周大鼠卵巢功能均受到一定损害,提示大鼠卵巢功能损害模型建模成功。但观察时间短,只进行了 4 周的研究,对于模型是否有自我恢复能力未做进一步观察。因此,结合前两个实验的优点与不足,设计了本实验。

本研究发现:在整个观察期间,两组造模大鼠无死亡,说明这种造模方法安全。CTX 造模后 1、2、3、4 周动情周期延长 7~16 d,动情间期延长 5~7 d;卵巢组织中原始卵泡、成熟卵泡数减少,初级卵泡、次级卵泡、闭锁卵泡增加;卵巢指数在造模后第 1、2、3、4、6 周明显降低,FSH、LH 在造模后第 1、2、3、4、6 周明显升高,E2、AMH、INHB 在造模后第 1、2、3、4、6、8 周明显降低。表明 CTX 75 mg/kg 单次腹腔注射用药建立卵巢功能损害的大鼠模型是成功的,与文献报道一致。

造模后 2 周 AMH 较造模后 1 周稍有升高,造模后 3 周 E2 较造模前 2 周稍有升高,造模后 4 周 INHB 较造模前 3 周稍有升高。造模后 6 周大鼠恢复规律的动情周期,卵巢组织形态恢复,但(下转第 2188 页)

Death Dis, 2014, 5; e1185.

- [6] WANG Y, GE C, CHEN J, et al. GSK-3 β inhibition confers cardioprotection associated with the restoration of mitochondrial function and suppression of endoplasmic reticulum stress in sevoflurane preconditioned rats following ischemia/reperfusion injury[J]. *Perfusion*, 2018, 33(8): 679-686.
- [7] SHOHREH M, SIMON K, JOHN P, et al. Compound C enhances tau phosphorylation at Serine396 via PI3K activation in an AMPK and rapamycin independent way in differentiated SH-SY5Y cells[J]. *Neuros Lett*, 2018, 670(23): 53-61.
- [8] SHOHREH M, JOHN HT P, SIMON A K, et al. The impact of tau hyperphosphorylation at Ser262 on memory and learning after global brain ischaemia in a rat model of reversible cardiac arrest[J]. *IBRO Rep*, 2016, 2: 1-13.
- [9] MANCINELLI R, CARPINO G, PETRUNGARO S, et al. Multifaceted roles of GSK-3 in cancer and autophagy-related diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 4629495.
- [10] SINGH R, KAUSHIK S, WANG Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. *Nature*, 2009, 458(4097): 1131-1135.
- [11] LIU L, JIN X, HU C F, et al. Exosomes derived from

mesenchymal stem cells rescue myocardial ischaemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy via AMPK and Akt pathways[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(1): 52-68.

- [12] RONG S L, WANG X L, ZHANG C Y, et al. Transplantation of HGF gene-engineered skeletal myoblasts improve infarction recovery in a rat myocardial ischemia model[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0175807.
- [13] ANZOVINO A, CHIANG S, BROWN B E, et al. Molecular alterations in a mouse cardiac model of friedreich ataxia: an impaired Nrf2 response mediated via up regulation of Keap1 and activation of the Gsk3 β axis[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(12): 2858-2875.
- [14] BÉNARD L, OH J G, CACHEUX M, et al. Cardiac stim1 silencing impairs adaptive hypertrophy and promotes heart failure through inactivation of mTORC2/Akt signaling[J]. *Circulation*, 2016, 133(15): 1458-1471.
- [15] KAMARUDIN M N, MOHD RAFLEE N A, HUSSEIN S S, et al. (R)-(+)- α -lipoic acid protected NG108-15 cells against H₂O₂-induced cell death through PI3K-Akt/GSK-3 β pathway and suppression of NF- κ B-cytokines[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 1765-1780.

(收稿日期: 2018-12-26 修回日期: 2019-03-16)

(上接第 2183 页)

原始卵泡数减少。造模后第 8 周卵巢指数较前 6 周稍有升高。说明 CTX 对卵巢储备功能损伤是肯定的, 但模型有一定的自我修复能力, 并未形成卵巢衰竭的状态, 符合 DOR 的疾病发病特点。众所周知, 卵巢功能一旦到了衰竭状态, 治疗难度很大, 目前尚未发现有药物能逆转已经衰竭的卵巢功能, 但如果在疾病发生的早期就给予药物干预, 卵巢功能衰竭的速度可减慢, 甚至有逆转可能。

综上所述, 采用 75 mg/kg CTX 单次腹腔注射能成功制造 SD 大鼠 DOR 模型。该法操作简便易行、造模时间短、成功率高, 模型有一定的自我修复能力, 值得推广应用。

参考文献

- [1] 刘惠芬, 杨冬梓, 罗亦娟. 环磷酰胺对大鼠卵巢功能的影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2009, 30(22): 99-102.
- [2] 王方圆, 谢超, 程蔚蔚, 等. 环磷酰胺化疗导致小鼠卵巢功能损伤模型的建立[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2011, 31(10): 1398-1402, 1408.
- [3] 中华医学会妇产科分会绝经学组. 早发性卵巢功能不全的激素补充治疗专家共识[J]. *中华妇产科杂志*, 2016, 12(51): 881-886.
- [4] Practice committee of the american society for reproduc-

tive medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion[J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(6): 1407-1415.

- [5] 王超君, 吴浩. 卵巢储备功能减退病因及处理[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2015, 31(8): 723-726.
- [6] OKTAY K, MOY F, TITUS S, et al. Age-related decline in DNA repair function explains diminished ovarian reserve, earlier menopause, and possible oocyte vulnerability to chemotherapy in women with BRCA mutations[J]. *Clin Oncol*, 2014, 32(10): 1093-1094.
- [7] 曾琴, 刘伟信, 罗孟军, 等. 抗冷冻蛋白 III 减少家兔卵巢组织冷冻损伤的效果观察[J]. *实用妇产科杂志*, 2016, 32(5): 383-387.
- [8] MEIROW D, ASSAD G, DOR J, et al. The GnRH agonist reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice[J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(6): 1294-1299.
- [9] 高飞飞, 张剑, 王吉波. 环磷酰胺对育龄妇女卵巢损伤的临床研究[J]. *临床合理用药杂志*, 2017, 10(8): 63-64.
- [10] FALCONE T, BEDAIWY M A. Fertility preservation and pregnancy outcome after malignancy[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2005, 17(1): 21-26.
- [11] 陈小平. 卵巢功能减退的临床影响因素与实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.

(收稿日期: 2019-01-13 修回日期: 2019-03-21)