

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.11.012

论著·基础

杞月茶对卵巢储备功能下降大鼠卵巢组织 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

肖慧, 刘宇, 朱英英, 李军

基金项目: 2018 国家重点研发计划课题任务 (2018YFC1704106); 北京中医药大学新奥奖励基金课题 (2019-XAJLJJ-013);

北京中医药大学东直门医院三名工程教学类资助基金青年教学名师项目 (405120413)

作者单位: 100700 北京中医药大学东直门医院妇科/郭志强传承工作室/北京中医药薪火传承“3+3 工程”郭志强名中医传承工作站

通信作者: 李军, E-mail: 1441731976@qq.com

【摘要】目的 探讨杞月茶治疗卵巢储备功能下降大鼠的潜在机制。方法 2021 年 3—5 月于北京中医药大学东直门医院中心实验室进行实验。6 周龄 SD 大鼠 24 只, 随机数字表法分为空白组、模型组、杞月茶组、戊酸雌二醇片(补佳乐)组, 每组 6 只。除空白组外, 其余大鼠腹腔注射 VCD 160 mg/kg 制备卵巢储备功能下降(DOR)模型。造模成功后, 杞月茶组予杞月茶 24 g/kg 剂量灌胃, 补佳乐组予补佳乐 0.12 mg/kg 灌胃, 空白组及模型组予生理盐水 3 ml/kg 灌胃, 连续灌胃 4 周。干预结束后, ELISA 检测各组大鼠血清促卵泡激素(FSH)、雌二醇(E_2)、抗苗勒管激素(AMH)的含量, 取卵巢组织采用 HE 染色观察卵巢形态, 免疫组织化学法检测卵巢 Bax 与 Bcl-2 蛋白表达, 蛋白印迹法检测卵巢 Bcl-2/Bax 表达水平。结果 与空白组比较, 模型组大鼠中初次级卵泡减少, 闭锁卵泡增多; 杞月茶组及补佳乐组初次级卵泡及成熟卵泡较多, 闭锁卵泡较模型组减少。与空白组比较, 模型组卵巢体质量指数、AMH 水平降低, FSH 水平升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 杞月茶组及补佳乐组卵巢体质量指数、AMH 水平升高, FSH 水平降低($P < 0.05$)。Bax 蛋白主要表达在颗粒层细胞、黄体及间质, 模型组大鼠较空白组表达升高, 杞月茶组及补佳乐组较模型组表达降低($P < 0.05$)。模型组 Bcl-2/Bax 比值较空白组降低($P < 0.05$); 杞月茶组及补佳乐组 Bcl-2/Bax 比值高于模型组($P < 0.05$)。结论 杞月茶可降低 DOR 大鼠血清中 FSH 水平、升高 AMH 水平, 与下调卵巢组织中细胞凋亡因子 Bax 的表达有关。

【关键词】 卵巢储备功能下降; 杞月茶; 性激素; Bcl-2 蛋白; Bax 蛋白; 大鼠**【中图分类号】** R711.75 **【文献标识码】** A

Effects of Qiyue Tea on the expression of Bax and Bcl 2 proteins in ovarian tissue of rats with decreased ovarian reserve Xiao Hui, Liu Yu, Zhu Yingying, Li Jun. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding author: Li Jun, E-mail: 1441731976@qq.com

Funding program: 2018 National Key R & D Program Task (2018YFC1704106); Project of the New Olympic Award Fund of Beijing University of Traditional Chinese Medicine (2019-XAJLJJ-013); “Sanming” Young Teachers Project of the Engineering Teaching Fund of Dongzhimen Hospital of Beijing University of traditional Chinese medicine (405120413)

【Abstract】 Objective To explore the potential mechanism of Qiyue Tea in the treatment of rats with decreased ovarian reserve. **Methods** From March to May 2021, experiments will be conducted in the central laboratory of Dongzhimen Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine. Twenty-four 6-week-old SD rats were randomly divided into blank group, model group, Qiyue Tea group, and estradiol valerate tablet (Progalo) group, with 6 rats in each group. Except for the blank group, the other rats were intraperitoneally injected with VCD 160 mg/kg to establish a model of decreased ovarian reserve (DOR). The rats in the control group were given 0.12 mg/kg of Procyone by gavage, and the blank group and the model group were given 3 ml/kg of normal saline by gavage for 4 weeks. After the intervention, the serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E_2) and anti-Müllerian hormone (AMH) were detected by ELISA. The protein expressions of Bax and Bcl2 in the ovary were detected, and the expression level of Bcl2/Bax in the ovary was detected by Western blotting. **Results** Compared with the blank group, the number of primary and secondary follicles in the model group decreased and the number of atretic follicles increased; the Qiyue Tea group and the Bujiale group had more primary and mature follicles, and

fewer atretic follicles than the model group. Compared with the blank group, the ovarian BMI and AMH levels in the model group decreased, while the FSH level increased ($P < 0.05$). FSH level decreased ($P < 0.05$). Bax protein was mainly expressed in the granulosa cells, corpus luteum and interstitium. Compared with the blank group, the expression of Bax protein in the model group was higher than that in the blank group. The ratio of Bcl 2/Bax in the model group was lower than that in the control group ($P < 0.05$); the ratio of Bcl 2/Bax in the Qiyue Tea group and Bujiale group was higher than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Qiyue Tea can reduce the level of FSH and increase the level of AMH in serum of DOR rats, which is related to down-regulating the expression of apoptosis factor Bax in ovarian tissue.

【Key words】 Decreased ovarian reserve; Qiyue Tea; Sex hormones; Bcl-2 protein; Bax protein, Rats

卵巢储备功能下降 (decreasing ovarian reserve, DOR) 是指卵巢内存留的可募集的卵泡数量减少, 卵巢产生卵子的能力减弱, 卵母细胞质量下降, 导致生育能力下降。卵巢功能减退临床表现为月经周期紊乱、闭经、潮热、失眠、不孕等症状。DOR 没有统一的诊断标准, 实验室检测中常以基础 FSH 水平升高但未达到绝经期的水平, AMH 水平降低, 窦卵泡计数减少为标准^[1]。辅助生殖技术协会临床结果报告系统 (SART CORS) 称^[2], 2004—2011 年诊断为 DOR 的人数从 19% 增加到 26%, 而年龄在 40 岁以下的诊断人数增加了 42%。DOR 是一个复杂的临床现象, 其病因不详, 受年龄、遗传、自身免疫和环境因素的影响^[3]。目前治愈较为困难, 已成为妇科内分泌相关领域关注的难点及热点问题。

前期动物实验研究发现^[4] 杞月茶能够改善 DOR 模型大鼠的性激素水平, 并探索出药物的适宜浓度, 本研究在此基础上, 进一步研究杞月茶改善大鼠卵巢储备功能的机制, 报道如下。

1 材料及方法

1.1 材料 (1) 动物及分组: SPF 级雌性 SD 大鼠 24 只 [北京维通利华, 动物许可证号: SCXK(京) 2016-0011] 6 周龄, 体质量 190 ~ 210 g, 动物伦理审查批号 (21-23)。(2) 试剂: 1- β -乙炔基-4-环己烯二环氧氧化物 (VCD, sigma BCBV1352), 戊酸雌二醇片 [补佳乐, 拜耳医药保健有限公司广州分公司], 杞月茶 (枸杞子 15 g, 月季花 10 g) 免煎颗粒 (北京康仁堂药业有限公司)。血清促卵泡激素 (FSH)、雌二醇 (E_2)、抗苗勒管激素 (AMH) 酶联免疫试剂盒 (BLUE GENE 公司)、兔抗 BCL-2 抗体 (Proteintech SJ08108)、小鼠 BAX 抗体 (Proteintech SJ08109)。(3) 仪器设备: 离心机 (上海赵迪生物科技有限公司, 型号 AXTGL16M)、切片机 (德国 H93, 型号 RM2126)、石蜡包埋机 (德国 Leica EG1160)、显微镜 (日本 ECLIPSE LV100POL 公司, 型号 50IPOL)、全自动酶标仪 (美国 BioTek 公司, 型号 ELx800)、水浴锅 (江苏金坛市荣华仪器公司, 型号 SHA-C)。

1.2 实验方法 2021 年 3—5 月于北京中医药大学东直门医院中心实验室进行实验。大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、杞月茶组、补佳乐组, 每组 6 只, 屏障环境喂养。除空白组外, 其余大鼠进行卵巢储备功能下降造模^[5]: 按 VCD 160 mg/kg 予大鼠腹腔注射, 每日 1 次, 连续给药 5 d。大鼠卵巢储备功能下降模型造模成功判断标准: 每日做阴道脱落细胞涂片, 观察动情周期。腹腔注射结束 1 个动情周期后动情期紊乱者, 认为造模成功。造模成功后, 杞月茶组予杞月茶 24 g/kg 剂量灌胃, 补佳乐组予补佳乐 0.12 mg/kg 灌胃, 空白组及模型组正常饮食并予生理盐水 3 ml/kg 灌胃, 各组均每天 1 次, 连续灌胃 4 周, 每周停止灌胃 1 d^[4]。模型组 1 只大鼠在实验第 33 天意外死亡。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 大鼠一般情况观察: 记录大鼠体质量、双侧卵巢体质量指数、子宫体质量指数^[6]、饮食活动情况, 光镜下观察阴道上皮脱落细胞变化情况, 动情周期变化。

1.3.2 性激素水平检测: 大鼠最后 1 次给药后, 禁食 12 h, 腹腔注射 0.4% 戊巴比妥 1 ml/100 g, 大鼠麻醉后, 75% 酒精消毒腹部皮肤, 打开腹腔, 腹主动脉取血 4 ml, 离心取血清, 以酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清 FSH、 E_2 、AMH 的含量。

1.3.3 卵巢形态学观察: 选取大鼠右侧卵巢 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋、切片, HE 染色, 普通光学显微镜观察卵巢组织形态学变化。

1.3.4 卵巢颗粒细胞 (granulosa cell, GC) 凋亡因子 Bcl-2、Bax 免疫组化检测: 各组随机选取 3 只大鼠右侧卵巢组织石蜡切片脱蜡, 用 PBS 冲洗 3 次, 3% H_2O_2 室温孵育 10 min, 蒸馏水冲洗, 滴加 Fas、FasL 单克隆抗体, 37℃ 孵育 1 ~ 2 h, PBS 冲洗 2 min \times 3 次, 分别滴加 1:1 000、1:400 稀释的一抗 Bax、Bcl-2, 37℃ 孵育 1 h, PBS 冲洗 2 min \times 3 次, 滴加第二代生物素标记二抗工作液, 37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 2 min \times 3 次, DAB 显色剂显色, 自来水充分冲洗, 苏木精复染、封片。免疫组化染色后, 细胞质为棕色或深棕色为阳性标记。使

用高倍显微镜随机选择 5 个视网膜视野用 IPP 6.0 软件定量测量各个指标平均光密度(IOD)。

1.3.5 卵巢颗粒细胞 Bcl-2/Bax 蛋白印迹检测: 蛋白印迹法检测卵巢颗粒细胞 Bcl-2/Bax 表达水平,取出左侧卵巢组织(-80℃ 冰箱保存),取 50 μg 蛋白在冰浴条件下加入细胞裂解液提取总蛋白并测定浓度,待检测蛋白样品上样量为 10 μl,打开电泳装置,浓缩胶恒压 90 V 约 120 min; 分离胶恒压 120 V 通过预染蛋白 marker 来确定电泳停止时间。湿转法转膜条件: 300 mA 恒流; 0.45 μm 孔径 PVDF 膜,转膜时间 90 min。封闭: 将膜完全浸没于 5% BSA-TBST 中,水平摇床孵育 1 h。加入稀释 1:10 000、1:1 000 的 Bax 及 Bcl-2 一抗,4℃ 水平摇床孵育过夜,β-actin 作为内参。次日, TBST 洗膜洗 3 次,每次 10 min。加入 1:10 000 稀释的二抗,室温孵育 45 min。洗膜同上。ECL 滴加到膜的蛋白面,反应 3 min; 胶片曝光显影 2 min,定影。利用 IPP 6.0 软件定量测量平均光密度。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用 ANOVA 方差分析,组间两两比较采用 LSD *t* 检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较 大鼠造模后出现躁动表现,阴道上皮脱落细胞处于动情间期,经干预后可见明显动情周期。各组间大鼠体质量比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。与空白组比较,模型组卵巢体质量指数降低(*P* < 0.05);与模型组比较,杞月茶组、补佳乐组卵巢体质量指数升高(*P* < 0.05),但杞月茶组与补佳乐组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05);各组大鼠子宫体质量指数比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1。

2.2 各组大鼠血清性激素水平比较 与空白组比较,模型组血清 FSH 水平升高,AMH 水平降低(*P* < 0.05);

表 1 各组大鼠一般情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of general conditions of rats in each group

组别	<i>n</i>	体质量 (g)	卵巢体质量指数 (10 ⁻³ × 100%)	子宫体质量指数 (10 ⁻³ × 100%)
空白组	6	314.17 ± 39.66	0.127 ± 0.02	0.381 ± 0.10
模型组	6	282.67 ± 36.57	0.086 ± 0.03 ^a	0.337 ± 0.13
杞月茶组	5	307.40 ± 33.86	0.108 ± 0.01 ^b	0.383 ± 0.05
补佳乐组	6	300.00 ± 29.24	0.117 ± 0.02 ^b	0.437 ± 0.11
<i>F</i> 值		1.058	4.488	1.014
<i>P</i> 值		0.389	0.015	0.407

注: 与空白组比较, ^a*P* < 0.05; 与模型组比较, ^b*P* < 0.05

与模型组比较,杞月茶组及补佳乐组血清 FSH 水平均降低,AMH 水平升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05),但杞月茶组与补佳乐组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05);各组血清 E₂ 水平比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 2。

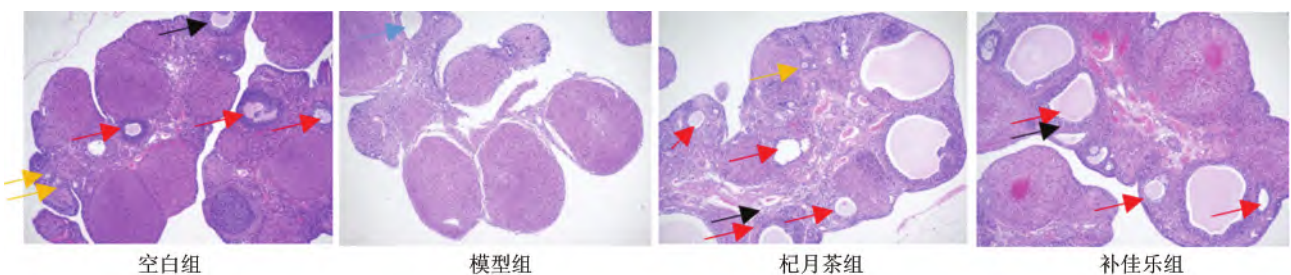
表 2 各组大鼠血清性激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of serum sex hormone levels of rats in each group

组别	<i>n</i>	FSH(μg/L)	E ₂ (ng/L)	AMH(μg/L)
空白组	6	5.69 ± 1.59	113.93 ± 33.97	1.86 ± 0.13
模型组	6	7.97 ± 1.34 ^a	102.03 ± 12.95	1.38 ± 0.30 ^a
杞月茶组	5	5.89 ± 1.26 ^b	110.62 ± 9.70	1.72 ± 0.17 ^b
补佳乐组	6	5.39 ± 1.90 ^b	134.94 ± 25.51	1.67 ± 0.20 ^b
<i>F</i> 值		3.394	2.159	5.460
<i>P</i> 值		0.039	0.126	0.007

注: 与空白组比较, ^a*P* < 0.05; 与模型组比较, ^b*P* < 0.05

2.3 各组大鼠卵巢形态学比较 空白组可见较多原始卵泡及初次级卵泡,颗粒细胞多,未见明显闭锁卵泡;模型组大鼠卵巢可见少量初次级卵泡及少量原始卵泡,颗粒细胞较少,可见较多闭锁卵泡;杞月茶组及补佳乐组初次级卵泡及成熟卵泡较多,颗粒细胞及闭锁卵泡较模型组减少,见图 1。



注: 黄色箭头, 原始卵泡; 红色箭头, 初次级卵泡; 黑色箭头, 颗粒细胞; 蓝色箭头, 闭锁卵泡

图 1 各组大鼠卵巢形态比较(HE 染色, ×40)

Fig. 1 Comparison of ovarian morphology of rats in each group (HE staining, ×40)

2.4 大鼠卵巢颗粒细胞中 Bcl-2、Bax 凋亡因子及其 Bcl-2/Bax 蛋白表达比较 卵巢颗粒细胞免疫组化中, 各组 Bax 蛋白主要表达在颗粒层细胞、黄体及间质。与空白组比较 模型组 Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较 杞月茶组及补佳乐组 Bax 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 而杞月茶组与补佳乐组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Bcl-2 蛋白主要表达在各级卵泡的细胞核中, 其表达在每组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2、表 3。为进一步明确 Bcl-2 及 Bax 蛋白在卵巢组织中的表达, 同时进行了组织蛋白印迹检测, 与空白组比较, 模型组 Bcl-2/Bax 凋亡因子比值降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较 杞月茶组及补佳乐组 Bcl-2/Bax 凋亡因子比值显著升高 ($P < 0.05$), 而杞月茶组与补佳乐组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3、表 3。

表 3 各组大鼠卵巢组织细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The protein expression levels of Bcl-2 and Bax in ovarian tissue cells of rats in each group

组别	n	Bcl-2(IOD)	Bax(IOD)	Bcl-2/Bax
空白组	3	5.37 ± 2.82	27.73 ± 9.22	0.90 ± 0.32
模型组	3	5.22 ± 5.29	55.93 ± 37.34 ^a	0.37 ± 0.20 ^a
杞月茶组	3	4.64 ± 3.18	32.23 ± 11.77 ^b	0.80 ± 0.15 ^b
补佳乐组	3	4.92 ± 2.82	31.91 ± 13.66 ^b	0.85 ± 0.28 ^b
F 值		0.081	5.465	4.101
P 值		0.970	0.002	0.049

注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

3 讨论

在 DOR 的治疗上, 西医主要采用激素替代疗法, 但仅具有改善症状、促进月经来潮的作用, 对于改善生育能力方面疗效有限。多项研究显示, 中医在 DOR 的

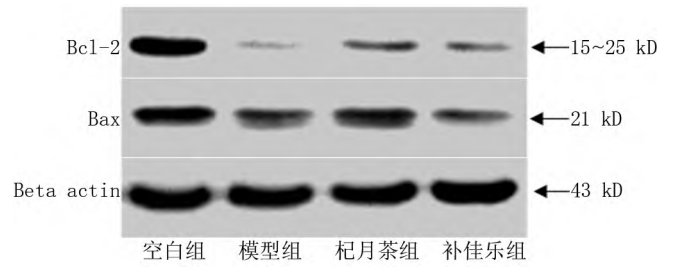


图 3 各组大鼠卵巢组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达电泳图

Fig. 3 The electrophoresis of Bcl-2 and Bax protein expression in ovarian tissue of rats in each group

治疗中发挥着良好的作用。中医认为, 该病在病机上多以肾精亏虚、天癸不足为其根本, 并可伴有肝郁、脾虚、血瘀等证^[7]。

郭志强认为, 卵巢储备功能下降的病机是以肝肾阴虚为主, 兼见脾肾阳虚、肝郁化火、心肾不交等^[8]。其发生与现代女性的一些不良生活习惯有关。王云欢^[9]通过对临床病例数据挖掘, 分析出女性卵巢功能低下与性生活、情绪、锻炼及睡眠有密切关系, 郭氏中药序贯疗法可有效改善患者月经、妊娠率、改良中医症状评分、卵巢直径等, 临床疗效满意, 并基于此提出滋补肝肾、养血柔肝的治疗方法。实验采用郭志强临床常用滋肾养肝法的君臣药——“枸杞子”和“月季花”制备代茶饮“杞月茶”, 具有补肾填精养血、柔肝疏肝、理气活血的作用, 可从根本上调理肝肾, 刺激卵巢发育和卵泡生长, 在缓解症状的同时提高一定的生育能力^[4]。

颗粒细胞(GC)的增殖、凋亡及激素分泌与卵泡的发育、卵母细胞的成熟密切相关。已有研究表明, Bcl-2家族成员在调节卵巢细胞凋亡、决定卵巢颗粒细胞和卵泡寿命等方面发挥重要作用^[10-12]。其中, Bcl-2

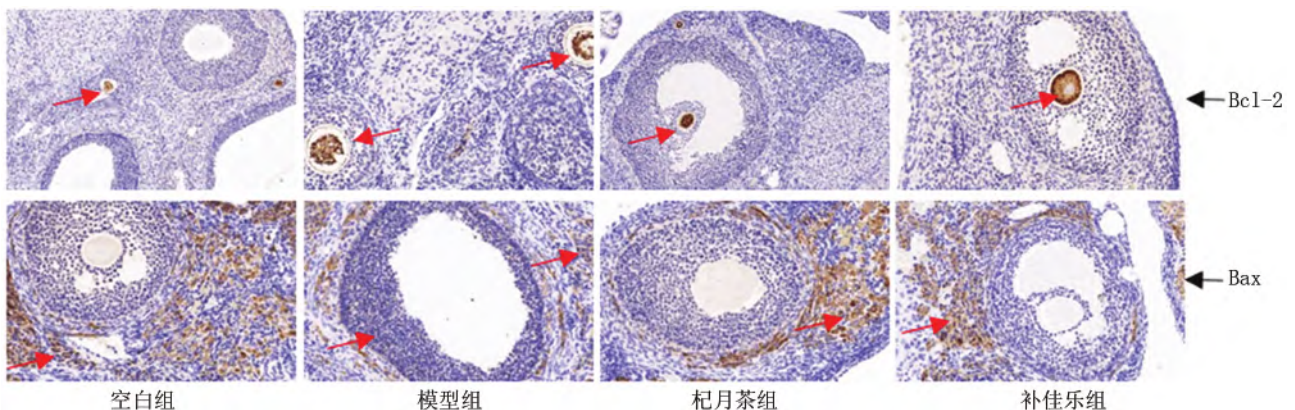


图 2 各组大鼠卵巢组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达情况比较(免疫组化染色, ×400)

Fig. 2 Comparison of Bcl-2 and Bax protein expression in ovarian tissue of rats in each group (immunohistochemical staining , ×400)

是一种抑制细胞凋亡、延长细胞存活的细胞内蛋白,而 Bax 是 Bcl-2 同源基因,过度表达的 Bax 可促进细胞凋亡^[13-15]。

卵巢颗粒细胞在卵泡生长中起到重要作用,相关激素均由卵巢颗粒细胞分泌,或在其上表达^[16-18]。卵泡的生长主要是由 FSH 调节的,FSH 由垂体分泌,负责卵巢卵泡的刺激和生长,而卵泡刺激素受体(FSHR)主要在卵泡颗粒细胞上表达。E₂ 由卵泡中的卵泡膜细胞和卵巢颗粒细胞产生,E₂ 水平升高对下丘脑—垂体—卵巢轴 FSH 分泌呈负反馈调节。AMH 可由原发性和继发性卵泡的颗粒细胞分泌,并抑制原始卵泡生长的发育,调控卵泡的发育速度。FSH 和 E₂ 是主要的抗凋亡因子^[19]。因此在 VCD 造模法诱导的 DOR 大鼠模型存在卵泡闭锁,AMH 水平降低,FSH 水平升高现象,干预后可改善 DOR 大鼠内分泌紊乱,改善卵巢状态,且补佳乐及杞月茶治疗效果相当。

Bcl-2 家族已被证明在调节卵巢生殖细胞的命运中起着至关重要的作用。Bax 是 Bcl-2 同源基因,二者互为拮抗作用,Bax 蛋白表达水平上调,Bcl-2 活性下降会促进细胞凋亡。Bax 对原始生殖细胞、卵原细胞和卵母细胞凋亡有着重要作用^[13]。Bax 可从原始卵泡开始出现,而 Bcl-2 仅出现在原始卵泡向次级卵泡转化过程中,进而导致原始卵泡闭锁^[19]。Bcl-2 可通过抑制胚胎生殖细胞或生长卵泡的凋亡来增加原始卵泡数量,以潜在地延长卵巢功能和生育能力。其编码的蛋白主要存在于细胞质内,受到凋亡信号诱导后,其结构可发生改变,转移至线粒体膜上并形成通道,从而诱导细胞凋亡^[20]。

多项研究中卵巢中 Bax 蛋白表达水平显著升高,Bcl-2 蛋白表达水平降低,导致 GC 凋亡增加,导致大量闭锁卵泡^[16],与本结果部分相似。一项研究表明,细胞质 Bcl-2 阳性可阻止细胞凋亡,而细胞核 Bcl-2 阳性可抑制转录因子和核因子 κ B 的活化,从而诱导细胞凋亡^[21]。本结果中 Bcl-2 主要表达在细胞核中,其可能是导致细胞凋亡的另一因素。

综上,杞月茶及补佳乐可降低 DOR 大鼠血清中 FSH 水平、升高 AMH 水平,两者治疗效果与下调细胞凋亡因子 Bax 在卵巢组织中的表达有关。杞月茶与补佳乐治疗效果之间差别不大,但杞月茶代茶饮更为便捷,更适合大众保健的需求,可从中医治未病角度出发,防止 DOR 的进一步进展。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

肖慧:实施研究过程,数据收集、分析,论文撰写;刘宇:协

助实验实施、数据收集;朱英英:协助数据分析;李军:提出研究思路和研究选题,设计研究方案、研究流程,设计论文框架,论文修订及审核

参考文献

- [1] Pastore LM, Christianson MS, Stelling J, et al. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2018, 35(1): 17-23. DOI: 10.1007/s10815-017-1058-4.
- [2] Devine K, Mumford SL, Wu M, et al. Diminished ovarian reserve in the United States assisted reproductive technology population: diagnostic trends among 181 536 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System[J]. *Fertility and Sterility*, 2015, 104(3): 612-619. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.05.017.
- [3] Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide[J]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2017, 217(2): 129-140. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.02.027.
- [4] 郭丽璇,李军,张茹,等.“杞月茶”对卵巢储备功能下降影响的研究及探讨[J]. *吉林中医药*, 2020, 40(5): 610-613. DOI: 10.13463/j.cnki.jlzy.2020.05.015.
- Guo LX, Li J, Zhang R, et al. Study on the effect of Qiyue Tea on the Decreasing Ovarian Reserve[J]. *Jinlin Journal of Transitional Chinese Medicine*, 2020, 40(5): 610-613. DOI: 10.13463/j.cnki.jlzy.2020.05.015.
- [5] 陆樱瑜,沈明洁,李佳慧,等.卵巢储备功能下降动物模型研究进展[J]. *生殖医学杂志*, 2014, 23(12): 996-999. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2014.12.017.
- Lu MY, Shen MJ, Li JH, et al. Progress in animal models of diminished ovarian reserve[J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2014, 23(12): 996-999. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2014.12.017.
- [6] Gao L, Zhao F, Zhang Y, et al. Diminished ovarian reserve induced by chronic unpredictable stress in C57BL/6 mice[J]. *Gynecological Endocrinology: the Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 2020, 36(1): 49-54. DOI: 10.1080/09513590.2019.1631274.
- [7] 王月娇,徐莲薇,刘小菲,等.卵巢储备功能下降的中医研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(6): 1047-1050.
- Wang YJ, Xu LW, Liu XF, et al. Advances in research on the etiology of decline in ovarian reserve[J]. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2021, 27(6): 1047-1050.
- [8] 李军,王必勤,薛晓鸥,等.郭志强治疗卵巢储备功能低下性不孕的临床思路[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(4): 467-468.
- Li J, Wang BQ, Xue XO, et al. Guo Zhiqiang's clinical ideas for the treatment of infertility with low ovarian reserve function[J]. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2015, 21(4): 467-468.
- [9] 王云欢.郭氏中药序贯疗法治疗卵巢储备功能低下的临床观察[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [10] Liew SH, Vaitiyanathan K, Hutt KJ. Taking control of the female fertile lifespan: a key role for Bcl-2 family proteins[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2016, 28(7): 864-871. DOI: 10.

1071/RD14326.

[11] 尹燕,金志春,杨雅琴,等. 补肾益气活血方对大鼠卵巢储备功能的影响与作用机制[J]. 中国计划生育学杂志, 2021, 29(2): 221-225. DOI: 10.3969/j.issn.1004-8189.2021.02.002.
Yin Y, Jin ZC, Yang YQ, et al. Effect and mechanism of BSYQH prescription on ovarian reserve function of rats[J]. Chinese Journal of Family Plannin, 2021, 29(2): 221-225. DOI: 10.3969/j.issn.1004-8189.2021.02.002.

[12] 王月娇,徐莲薇,刘小菲,等. 卵巢储备功能下降的中医研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(6): 1047-1050.
Wang YJ, Xu LW, Liu XF, et al. Advances in Research on the Etiology of Decline in Ovarian Reserve[J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2021, 27(6): 1047-1050.

[13] Pena-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis[J]. The FEBS Journal, 2018, 285(3): 416-431. DOI: 10.1111/febs.14186.

[14] 汪倩,卢鹤,李红晓,等. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路探讨艾灸对卵巢储备功能减退大鼠的炎性调控机制[J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(3): 280-288. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2021.03.014.
Jiang Q, Lu G, Li XH, et al. Inflammatory regulation mechanism of moxibustion on rats with diminished ovarian reserve based on Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2021, 44(3): 280-288. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2021.03.014.

[15] 安东,刘丽敏. 补肾类中成药治疗卵巢储备功能下降的 Meta 分析[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(20): 4425-4431. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.20.029.

[16] Ling L, Feng X, Wei T, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism[J]. Stem Cell Research & Therapy,

2019, 10(1): 46. DOI: 10.1186/s13287-019-1136-x.

[17] FAN Xingyan, 于莎, 汪云, 等. 高孕激素促排卵与克罗米芬微刺激方案在卵巢低储备患者取卵周期的可控性比较[J]. 中国临床医学, 2021, 28(4): 539-543. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210409.
FAN XY, Yu S, Wang Y, et al. Controllability comparison between progestin-primed ovarian stimulation and mild stimulation protocols in patients with diminished ovarian reserve in oocytes retrieval cycle [J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2021, 28(4): 539-543. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210409.

[18] 徐海霞,朱春兰,唐虹. 艾灸联合中药对多囊卵巢综合征不孕症患者卵巢储备功能的影响[J]. 上海针灸杂志, 2021, 40(5): 571-575. DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2021.05.0571.
Xu HX, Zhu CL, Tang H. Effect of Moxibustion Combined with Chinese Medication on Ovarian Reserve Function in Patients with Infertility Due to Polycystic Ovary Syndrome [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 2021, 40(5): 571-575. DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2021.05.0571.

[19] Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, et al. Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle—a changing view[J]. Frontiers In Endocrinology, 2018, 9: 61. DOI: 10.3389/fendo.2018.00061.

[20] Peng H, Zeng L, Zhu L, et al. Zuogui Pills inhibit mitochondria-dependent apoptosis of follicles in a rat model of premature ovarian failure [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 238: 111855. DOI: 10.1016/j.jep.2019.111855.

[21] Pallavi N, Nalabolu GRK, Hiremath SKS. Bcl-2 and c-Myc expression in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study to assess tumor progression [J]. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP, 2018, 22(3): 325-331. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_197_18.

(收稿日期: 2022-05-08)

(上接 1179 页)

[14] Sun F, Li N, Tong X, et al. Ara-c induces cell cycle G1/S arrest by inducing upregulation of the INK4 family gene or directly inhibiting the formation of the cell cycle-dependent complex CDK4/cyclin D1 [J]. Cell Cycle, 2019, 18(18): 2293-2306. DOI: 10.1080/15384101.2019.1644913.

[15] 付茂月,雷开键,贾钰铭,等. 多西他赛联合顺铂治疗晚期肺腺癌患者的临床疗效及其对免疫功能的影响[J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29(8): 48-53. DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2021.00.164.
Fu MY, Lei KJ, Jia YM, et al. Clinical Efficacy of Docetaxel Combined with Cisplatin in the Treatment of Advanced Lung Adenocarcinoma and the Impact on Immune Function of Patients[J]. Practical

Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2021, 29(8): 48-53. DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2021.00.164.

[16] Pan Y, Yu Y, Wang X, et al. Tumor-associated macrophages in tumor immunity [J]. Front Immunol, 2020, 11: 583084. DOI: 10.3389/fimmu.2020.583084.

[17] Abdel-Hamid NM, Abass SA. Matrix metalloproteinase contribution in management of cancer proliferation, metastasis and drug targeting [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(9): 6525-6538. DOI: 10.1007/s11033-021-06635-z.

[18] Jin C, Lin JR, Ma L, et al. Elevated spondin-2 expression correlates with progression and prognosis in gastric cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(6): 10416-10424. DOI: 10.18632/oncotarget.14423.

(收稿日期: 2022-06-20)