

GnRH激动剂和经血源性干细胞联合治疗对小鼠卵巢功能的影响

孙芳¹, 韦伟²

¹绍兴第二医院医共体总院药剂科, 浙江 绍兴 312000; ²浙江大学医学院附属邵逸夫医院妇产科, 浙江 杭州 310000

摘要:目的 探究促性腺激素释放激素(GnRH)激动剂和经血源性干细胞(MenSCs)联合治疗对小鼠卵巢功能的影响。方法 将45只SPF级实验小鼠随机分为Control组(腹腔注射生理盐水)、POF组(腹腔注射120 mg·kg⁻¹·d⁻¹ CTX)、MenSC+POF组(CTX损伤处理后注射移植含2×10⁶ MenSCs的细胞悬浮液)、GnRHa+POF组(造模前14 d注射丙氨瑞林0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹,第15天开始CTX注射)、MenSC+POF+GnRHa组(按MenSC+CTX组和GnRHa+CTX组方案联合用药),每组9只。HE染色观察小鼠卵巢组织病理变化情况,ELISA法检测小鼠血清中黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)、抗苗勒管激素(AMH)和雌二醇(E2)的含量水平,Western blot检测小鼠卵巢颗粒细胞中KI-67、Bcl-2、BAX、caspase 9、caspase 3、cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3、p-PI3K、PI3K、p-Akt及Akt蛋白的表达情况。结果 与Control组相比,POF组小鼠卵巢纤维化明显,闭锁卵泡数增多,血清中LH和FSH的含量水平极升高($P<0.01$),AMH和E2含量水平降低($P<0.01$),BAX、cleaved-caspase 9/caspase 9、cleaved-caspase 3/caspase 3蛋白表达水平升高($P<0.01$),KI-67、Bcl-2、p-PI3K、p-Akt蛋白的表达水平降低($P<0.01$);与POF组比较,GnRH激动剂和经血源性干细胞联合治疗可抑制小鼠卵巢闭锁卵泡的产生,降低小鼠血清中LH和FSH的含量水平($P<0.01$),提高AMH和E2的含量水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$),抑制小鼠卵巢颗粒细胞中BAX、cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3蛋白的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$),促进KI-67、Bcl-2、p-PI3K、p-Akt蛋白的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 GnRH激动剂和经血源性干细胞联合治疗可能通过上调PI3K-Akt信号通路表达,减少卵巢闭锁卵泡的产生,提高小鼠卵巢的储备功能,从而达到对卵巢修复和保护的目的。

关键词:促性腺激素释放激素激动剂;卵巢早衰;经血源性间充质干细胞;凋亡;激素水平

Effect of GnRH agonist combined with menstrual blood-derived stem cell transplantation on ovarian function in mice

SUN Fang¹, WEI Wei²

¹Department of Pharmacy, General Hospital of Shaoxing Second Hospital, Shaoxing 312000, China; ²Department of Obstetrics and Gynecology, Run Run Shaw Hospital Affiliated to Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of combined treatment with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and menstrual blood-derived stem cell (MenSC) transplantation on ovarian function in mice. **Methods** We tested the effect of GnRH agonist and MenSC transplantation, either alone or in combination, in a mouse model of premature ovarian failure (POF) induced by daily intraperitoneal injection of 120 mg/kg cyclophosphamide (CTX) for 15 days. Venirelin was administered at the daily dose of 0.1 mg via intravenous infusion, starting at 14 days before modeling; MenSC suspension (2×10⁶ cells) was injected into the ovarium 1 day after modeling. HE staining was used to observe ovarian pathologies of the mice. ELISA was used to detect serum levels of LH, FSH, AMH and E2. The expression levels of ki-67, Bcl-2, BAX, caspase 9, caspase 3, their cleavages, P-PI3K, PI3K, P-Akt and Akt proteins in ovarian granulosa cells were determined with Western blotting. **Results** The mouse models of POF showed obvious ovarian fibrosis with increased atresia follicles and had significantly elevated serum levels of LH and FSH ($P<0.01$), decreased serum levels of AMH and E2 ($P<0.01$), significantly increased ovarian expression levels of caspase 9, caspase 3, and their cleavages ($P<0.01$), and decreased expression levels of Ki-67, Bcl-2, P-PI3K and P-Akt ($P<0.01$). The combined treatment with GnRH agonist and MenSC transplantation obviously inhibited the production of ovarian atresia follicles, lowered serum levels of LH and FSH ($P<0.01$), and increased the levels of AMH and E2 ($P<0.05$ or 0.01) in the mouse models. The combined treatment also inhibited the expressions of BAX and cleaved caspase 9 and caspase 3 proteins ($P<0.05$ or 0.01) and enhanced the expressions of Ki-67, Bcl-2, P-PI3K, and p-Akt proteins ($P<0.05$ or 0.01) in ovarian granulococcus cells. **Conclusion** In mouse models of POF, GnRH agonist combined with MenSC transplantation can reduce the generation of ovarian atresia and improve ovarian reserve by up-regulating PI3K-Akt signaling pathway to achieve ovarian repair and protection.

Keywords: gonadotropin-releasing hormone agonist; premature ovarian failure; menstrual blood-derived stem cells; apoptosis; hormone levels

收稿日期:2021-07-28

基金项目:浙江省医药卫生科技计划(2020KY161);2019年浙江省教育厅一般科研项目(Y201941455)

作者简介:孙芳,主管药师,E-mail: tracyqq0630@163.com

通信作者:韦伟,硕士,副主任医师,E-mail: weiwei4460@sina.com

卵巢早衰(POF)是指由于卵巢储备能力不足,在40岁之前出现的月经稀发、闭经、性欲减退等围绝经期症状,是妇科的常见疾病。近些年来,由于社会压力增加及饮食变化等因素,导致其患者数量日益增长且呈年轻化趋势。然而POF的发病机制尚未明确,临床上最常用

的治疗方法为补充激素治疗^[1-4]。以干细胞为核心的细胞疗法虽然取得了一定的疗效,但是仍集中在动物实验,临床应用较少^[5,6]。

促性腺激素释放激素(GnRH)激动剂应用已久,主要利用下丘脑-垂体的负反馈通路机制直接促使黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)升高。间充质干细胞为多功能细胞,在多种疾病的临床治疗中具有很大的应用价值。相关研究表明,从经血中分离出的经血源性间充质干细胞(MenSCs),注射到卵巢早衰小鼠模型后可以分化成卵巢颗粒细胞,且卵巢质量、雌二醇(E2)水平和正常卵泡数量均明显增加^[7-10]。但是运用两种方法联合治疗POF尚未有相关报道,本实验利用环磷酰胺(CCTX)腹腔注射小鼠构建POF模型,研究GnRH激动剂和MenSCs联合治疗对化疗所致POF模型小鼠的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及细胞

45只6~8周的SPF级健康雌性昆明小白鼠,体质量为30~46g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产许可证号SCXK(沪)2018-0008,饲养于杭州鹰扬生物科技有限公司动物中心,动物使用SYXK许可证号(浙)2020-0024。本实验符合《实验动物管理条例》并通过医院伦理委员会的批准。

MenSCs取自邵逸夫医院生殖障碍重点实验室,于低糖DMEM培养基中进行培养,添加10%胎牛血清。

1.2 实验药品及试剂

CTX(Eaively),丙氨瑞林(Acmec),HE染液套装(SERVICEBIO),FITC Mouse Anti-Human CD44、CD73、CD34、CD90、CD146、CD133、CD45RO (BD BIOSCIENCES PHARMINGEN),Mouse Anti-Human CD49d-PE(联科生物),BCA蛋白定量试剂盒(Solarbio),Ki67、Bcl-2、Bax、caspase 9、caspase 3、Antibody-Internal[AF0198(1:2000)、AF6139(1:2000)、AF0120(1:3000)、AF6348(1:2000)、AF6311(1:2000),Affinity],GAPDH、cleaved-caspase 9 (Asp353)、cleaved-caspase 3 (Asp175)、p-AKT(Ser173)、Akt、PI3K、p-PI3K Antibody [AF7021(1:3000)、AF5240(1:2000)、AF7022(1:2000)、AF0016(1:2000)、AF6261(1:2000)、AF6241(1:2000)、AF3242(1:2000),Affinity],小鼠促黄体激素(LH)、小鼠促卵泡生长激素(FSH)、小鼠缪勒管抑制物质/抗缪勒管激素(MIS/AMH)、小鼠雌二醇(E2)ELISA试剂盒(批号:MM-0582M2、MM-0555M2、MM-44204M2、MM-0566M2,酶免)。

1.3 实验仪器

病理切片机(型号:RM2016,上海徕卡仪器有限公司),正置光学显微镜(型号:Nikon Eclipse E100,日本

尼康),二氧化碳培养箱(型号:Scientific BB150, Thermo),流式细胞仪(型号:C6,BD),化学发光仪(型号:610020-9Q,勤翔),酶标仪(型号:CMAXPlus,MD),倒置显微镜(型号:AE2000,Motic)。

1.4 实验分组及给药

取45只6~8周大的SPF级健康雌性昆明小白鼠按随机数字表法平均分为Control组、POF组、MenSC+POF组、GnRHa+POF组、MenSC+POF+GnRHa组,每组9只。Control组给予生理盐水腹腔注射1 mL/d,连续灌胃14 d。POF组腹腔注射120 mg/(kg·d)CTX,连续注射15 d。MenSCs+POF组于第16天(即CTX损伤处理之后)行干细胞局部注射移植,200 μ L细胞悬浮液,含 2×10^6 MenSCs。GnRHa+POF组中POF造模前14 d予丙氨瑞林0.1 mg/(kg·d)皮下注射,第15天开始CTX连续腹腔注射。MenSC+GnRHa+POF组按MenSC+CTX组和GnRHa+CTX组方案联合用药,其中MenSCs于第30天局部注射移植。MenSCs注射治疗约5 d,通过动情周期确定指标检测时间。

1.5 流式细胞术仪检测MenSCs细胞表面标志物的表达情况

胰酶消化贴壁细胞并收集细胞,用PBS清洗2次后重悬,按照分组加入对应的抗体,避光孵育30 min;孵育结束后,洗去未结合的抗体,重悬后上机检测。

1.6 HE染色观察小鼠卵巢组织病理变化情况

石蜡切片脱蜡至水,依次用苏木素、伊红染色后,脱水并封片,显微镜镜检,图像采集分析。

1.7 ELISA检测小鼠血清中相关激素含量水平

小鼠眼眶取血后,分离血清,依据试剂盒说明检测血清中LH、FSH、抗缪勒管激素(AMH)和E2的含量水平。

1.8 Western blot检测

提取小鼠卵巢颗粒细胞的蛋白,依据BCA蛋白浓度测定试剂盒说明测定样品的总蛋白浓度,行SDS-PAGE电泳后转至PVDF膜,TBST洗膜。行免疫印迹反应,封闭液封闭,加含一抗稀释液,4 $^{\circ}$ C过夜孵育,弃一抗,加入二抗(IgG H&L (HRP),稀释倍数为1:3000),室温摇床振荡反应1~2 h,回收二抗,TBST洗膜。以GADPH为内参,化学发光仪显影,chemi capture软件分析图像,测定各组小鼠颗粒细胞中KI-67、Bcl-2、BAX、caspase 9、caspase 3、cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3、p-PI3K、PI3K、p-Akt及Akt的蛋白表达情况。

1.9 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析,计量资料多组间用One-way-ANOVA单因素方差分析,组间比较采用SNK分析。方差不齐者采用Kruskal-Wallis H检验。所有数据以均数 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞术检测 MenSCs 细胞表面标志物的表达情况

MenSCs 高表达 CD44、CD49、CD73、CD90、CD146,低表达CD133、CD34、CD45(表1)。

表1 MenSCs细胞表面标志物的表达情况

Tab.1 Expression of MenSCs cell surface markers (Mean±SD, n=6)

Surface marker	CD44	CD49	CD73	CD90	CD146	CD133	CD34	CD45
Content	98.90±1.23	98.87±1.38	99.17±0.81	95.73±2.66	98.13±1.50	1.51±0.26	1.66±0.14	1.57±0.21

2.2 GnRH激动剂和经血源性干细胞联合治疗对小鼠卵巢的影响

治疗后POF组小鼠行动缓慢、食欲下降、体毛晦暗无光泽,整体状态较差, MenSC+POF、与POF+GnRHa组小鼠活动及进食基本正常, Control组及 MenSC+POF+GnRHa组小鼠活动正常, 进食正常, 体毛光滑而有光泽。Control组小鼠卵巢各级卵泡清晰可见, 卵泡数较多; 与Control组相比, POF组小鼠卵巢纤维化明

显, 卵巢中窦前卵泡及窦卵泡数量减少, 而闭锁卵泡数增多; 与POF组相比, MenSC+POF组与POF+GnRHa组卵巢组织中空泡及闭锁卵泡明显减少, 颗粒细胞数量增多且呈放射状整齐排列, 并开始出现各级卵泡, 成熟卵泡明显增多, MenSC+POF+GnRHa组卵巢组织中卵泡数量丰富, 各级卵泡均可见到, 黄体数量较多, 可见到少量闭锁卵泡(图1)。

与Control组相比, POF组小鼠卵巢组织原始卵泡、

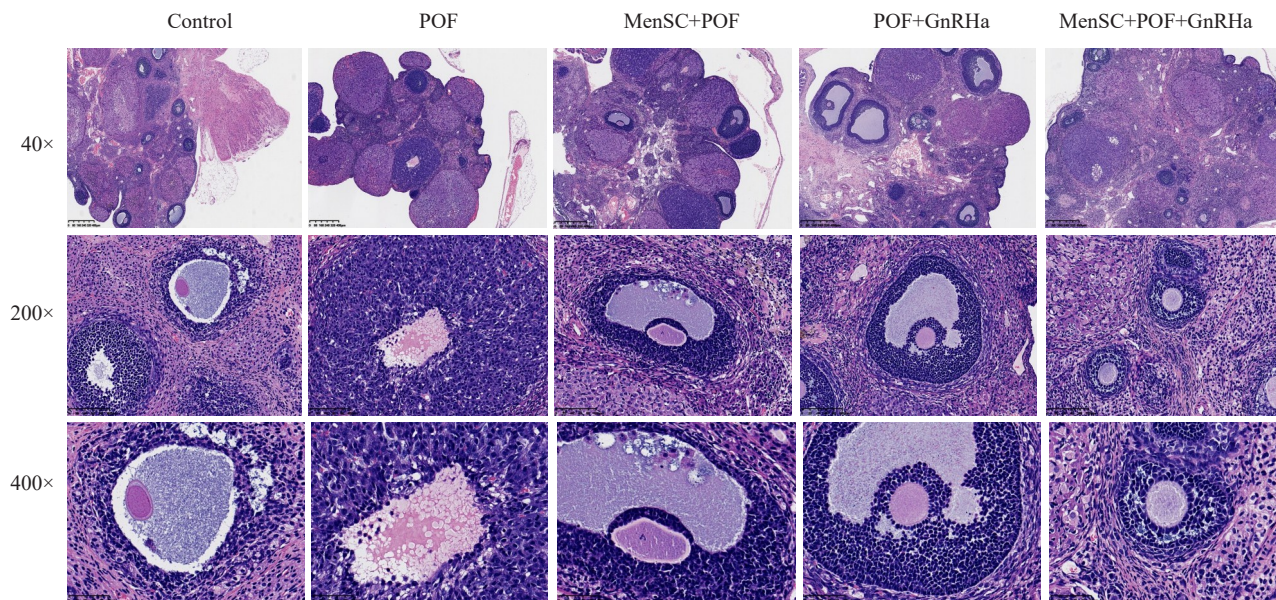


图1 小鼠卵巢组织病理学改变

Fig.1 Histopathological changes of mouse ovary.

初级卵泡与次级卵泡数显著降低($P<0.01$), 闭锁卵泡数显著升高($P<0.01$)。与POF组相比, MenSC+POF组小鼠卵巢组织原始卵泡显著升高($P<0.01$), 闭锁卵泡数显著降低($P<0.01$), POF+GnRHa组与 MenSC+POF+GnRHa组小鼠卵巢组织原始卵泡、初级卵泡与次级卵泡数显著升高($P<0.01$), 闭锁卵泡数显著降低($P<0.01$, 表2)。

2.3 GnRH激动剂和经血源性干细胞联合治疗对小鼠血清性激素水平的影响

与Control组比较, POF组小鼠血清中LH和FSH

的含量水平显著升高($P<0.01$), AMH和E2含量水平显著降低($P<0.01$); 与POF组比较, POF+GnRHa组和 MenSC+POF+GnRHa组血清中LH和FSH的含量水平显著降低($P<0.01$), AMH和E2的含量水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图2)。

2.4 GnRH激动剂和经血源性干细胞联合治疗对小鼠卵巢颗粒细胞中相关蛋白表达水平的影响

与Control组相比, POF组的小鼠卵巢颗粒细胞中BAX、cleaved-caspase 9/caspase 9、cleaved-caspase 3/caspase 3蛋白表达水平显著升高($P<0.01$), KI-67、

表2 小鼠卵巢组织各级卵泡统计

Tab.2 Statistics of follicles in mouse ovarian tissue (Mean±SD, n=6)

Group	Primitive follicles	Primary follicles	Secondary follicle	Atresia follicles
Control	17.33±1.37	5.5±0.55	3.17±0.75	3.83±0.75
POF	7.17±0.75 ^{△△}	1.83±0.41 ^{△△}	1.17±0.41 ^{△△}	7.00±0.63 ^{△△}
MenSC+POF	10.17±0.75 ^{**}	2.33±0.52	2.67±0.52 ^{**}	6.50±0.55
POF+GnRHa	14.17±1.17 ^{**}	3.17±0.75 ^{**}	3.33±0.52 ^{**}	4.83±0.75 ^{**}
MenSC+POF+GnRHa	15.83±1.47 ^{**}	5.17±0.41 ^{**}	2.5±0.55 ^{**}	3.33±0.52 ^{**}

POF: Premature ovarian failure; MenSC: Menstrual blood-derived stem cell; GnRHa; Gonadotropin-releasing hormone agonist. ^{△△}*P*<0.01 vs Control group, ^{**}*P*<0.01 vs POF.

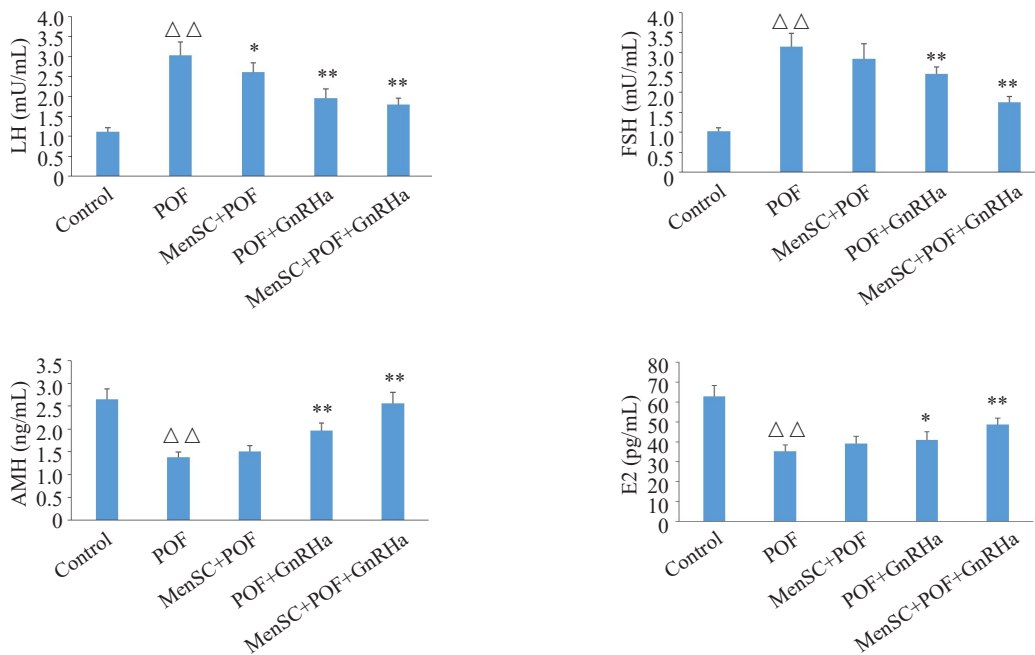


图2 各组别小鼠血清中LH、FSH、AMH和E2的含量水平

Fig.2 Serum levels of LH, FSH, AMH and E2 in each group (Mean±SD, n=6). ^{△△}*P*<0.01 vs Control group, ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01 vs POF.

Bcl-2的蛋白表达水平显著降低(*P*<0.01);与POF组相比,POF+GnRHa组和MenSC+POF+GnRHa组小鼠卵巢颗粒细胞中BAX、cleaved-caspase 9/caspase 9、cleaved-caspase 3/caspase 3蛋白表达水平显著降低(*P*<0.05或*P*<0.01),KI-67、Bcl-2的蛋白表达水平显著升高(*P*<0.05或*P*<0.01,图3)。

2.5 小鼠卵巢颗粒细胞中p-PI3K、PI3K、p-Akt及Akt蛋白的表达情况

与Control组相比,POF的小鼠卵巢颗粒细胞中p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平显著降低(*P*<0.01);与POF组相比,POF+GnRHa组和MenSC+POF+GnRHa组小鼠卵巢颗粒细胞中p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平显著升高(*P*<0.05或*P*<0.01,图4)。

3 讨论

近些年POF已成为临床上的常见病症,困扰着广

大的女性患者,POF发病主要与颗粒细胞的凋亡、脆性X智力障碍基因、AMH基因、生长分化因子9基因、叉头框因子-1基因、LRPPRC基因等的突变和缺失以及患者自身免疫功能异常以及线粒体功能异常等因素有关^[11,12]。作为治疗POF临床常用药物,GnRH激动剂对GnRH受体具有高亲和力,当GnRH激动剂占据GnRH受体后可减少腺垂体分泌FSH和LH,最终降低体内雌激素水平。有相关研究报道GnRH激动剂在恶性肿瘤化疗过程中具有保护绝经前女性卵巢功能的作用^[13-15]。作为一种新兴的细胞治疗方式,人类MenSCs能定向迁移到POF模型鼠的卵巢间质中,通过减少颗粒细胞凋亡和减轻卵巢间质纤维化来改善卵巢微环境进而恢复卵巢功能^[16-19]。

利用人经血来源间充质干细胞治疗卵巢早衰小鼠,卵巢组织增殖标记物Ki67升高,证明其治疗机制可能为促进细胞增殖^[7]。将热休克处理的间充质干细胞注

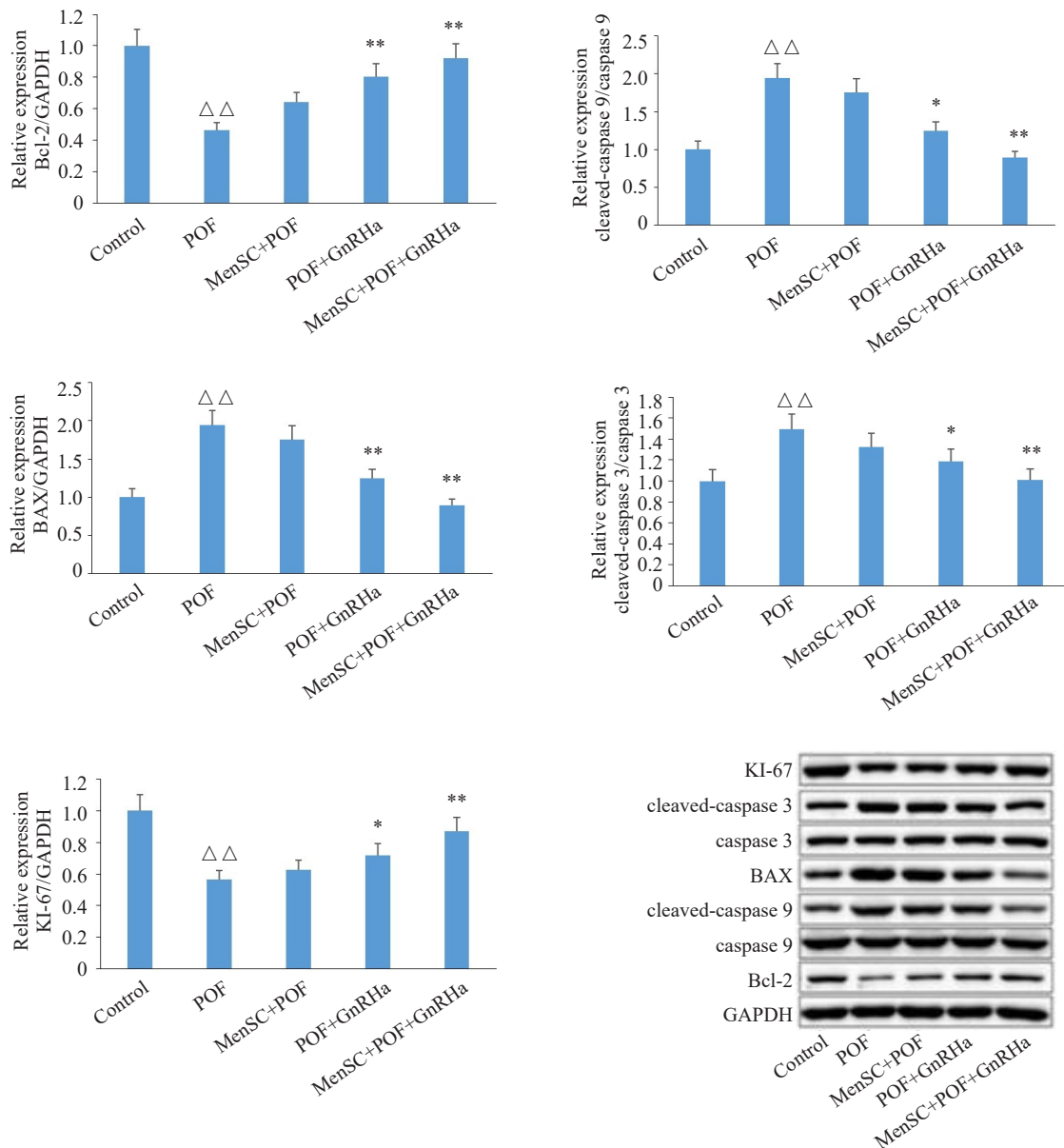


图3 小鼠卵巢颗粒细胞中KI-67、Bcl-2、BAX、Cleaved-Caspase 9、Cleaved-Caspase 3蛋白表达情况
 Fig.3 Protein expression of Ki-67, Bcl-2, BAX, cleaved caspase 9, and cleaved caspase 3 in different groups. △△*P*<0.01 vs Control group, **P*<0.05, ***P*<0.01 vs POF.

入大鼠卵巢后,卵巢质量和E2水平均增加,不同阶段的卵泡数量也相应增加,并降低卵泡刺激素水平和颗粒细胞凋亡率^[20, 21]。本研究采用GnRH激动剂和经血源性干细胞联合治疗POF小鼠模型,为明确本研究中的细胞来源和特性是否由原始具有多种分化能力的全能干细胞分化而来,本研究通过流式细胞术检测实验MenSCs中各蛋白表达水平,结果显示,所运用的经分离的经血干细胞高表达间充质干细胞表面标志物,如CD73、CD90、CD44等,不表达或低表达造血干细胞标志物CD34、CD38,表明实验所用细胞具有间充质干细胞的特性。HE染色结果显示GnRH激动剂和经血源性干细胞联合治疗对POF小鼠卵巢具有保护作用,可抑制卵巢纤维化,减少卵巢闭锁卵泡的产生。

PI3K-Akt信号通路广泛存在与细胞中,参与细胞生长,增殖,分化及凋亡的调节,Akt位于PI3K-Akt信号通路的中心,是最重要的PI3K下游靶酶。激素能够激活PI3K的活性,从而对下游信号通路进行调控,调节卵巢激素的分泌。相关研究报道,针刺治疗可通过提高E2的分泌水平进而调控PI3K/Akt/mTOR信号通路来实现对POF的治疗^[22-25]。曲晓力等^[26]分析了100例卵巢疾病患者的激素水平,结果显示血清FSH和LH激素水平与卵巢储备功能呈明显负相关,AMH与E2激素水平与卵巢储备功能呈明显正相关,表明AMH、FSH、LH、E2可作为患者卵巢储备功能评价的指标。在本研究中,与POF组比较,POF+GnRHa组和MenSC+POF+GnRHa组血清中LH和FSH的含量水平显著降低(*P*<

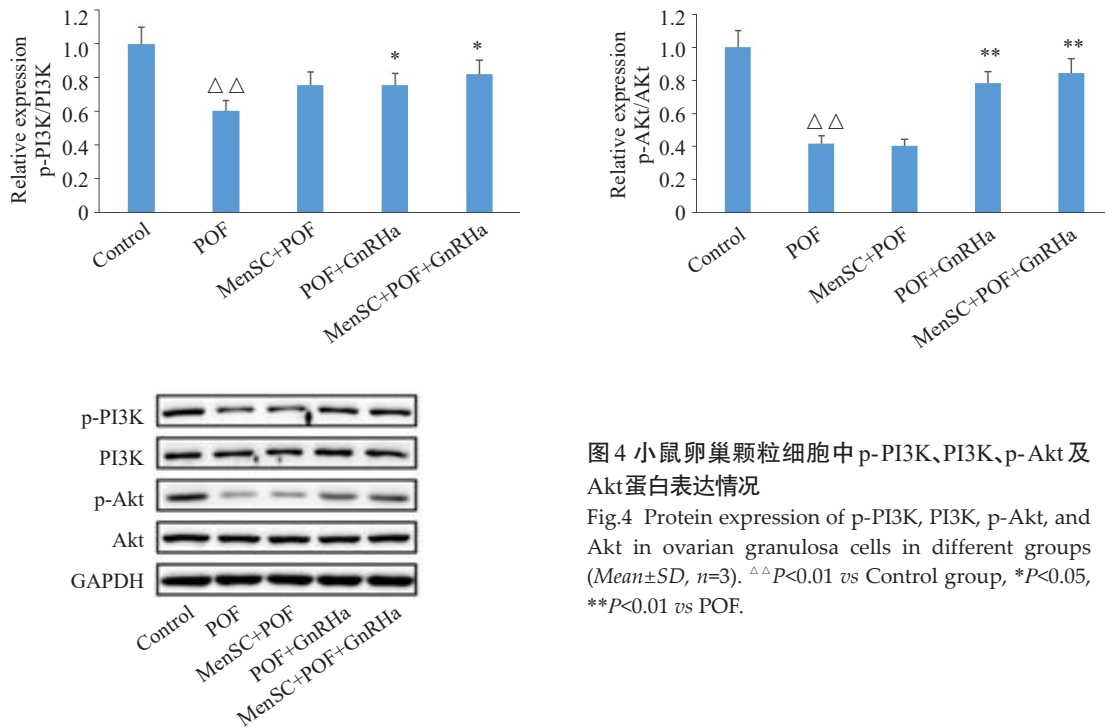


图4 小鼠卵巢颗粒细胞中 p-PI3K、PI3K、p-Akt 及 Akt 蛋白表达情况

Fig.4 Protein expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt, and Akt in ovarian granulosa cells in different groups (Mean±SD, n=3). ΔΔP<0.01 vs Control group, *P<0.05, **P<0.01 vs POF.

0.01), AMH 和 E2 的含量水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 推测 GnRH 激动剂和经血源性干细胞联合治疗, 可能通过调控 PI3K-Akt 信号通路改善 POF 小鼠的性激素水平, 提高 POF 小鼠卵巢的储备功能。

PI3K/Akt 与经典的凋亡途径有直接关联, 可以通过抑制各种转录因子的活性, 减少凋亡基因的表达下调细胞的凋亡过程。Bcl-2 是一种主要的凋亡抑制基因, BAX 基因是人体最主要的凋亡基因, KI-67 抗原是一种与细胞增殖相关的核抗原^[27, 28]。有研究在调查重组人乳铁蛋白对卵巢早衰的影响时发现, 在给药后 POF 大鼠的 KI-67 表达上调, BAX 的表达随 Bcl-2 的表达上调而降低^[29], 证明在治疗 POF 的过程中, Bcl-2、BAX、KI-67 具有重要作用。caspases 是一组存在于胞质溶胶中的结构上相关的半胱氨酸蛋白酶, 其顺序激活在细胞凋亡的执行阶段起着核心作用, 是一种肿瘤抑制因子。caspase-9 属于启动型 caspase, 处于细胞凋亡传导通路的起始部位, 当有其他辅助因子作用时, 发生自我活化, 激活下游的 caspase^[30], caspase-3 属于执行型 caspase, 能够特异性裂解底物, 使机体细胞发生形态学和生化改变, 发生细胞凋亡^[31]。本研究结果显示: 与 POF 组比较, GnRH 激动剂和经血源性干细胞联合治疗可抑制小鼠卵巢颗粒细胞中 BAX、cleaved-caspase 9、cleaved-caspase 3 的蛋白表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 促进 KI-67、Bcl-2 的蛋白表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。表明 GnRH 激动剂和经血源性干细胞联合治疗可抑制颗粒细胞的凋亡, 且其原因可能为多基因共同作用的结果。而在联合治疗后, p-PI3K、p-Akt 的蛋白表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$) 升高表明多基因作用可能由 PI3K-Akt 信号通路调控产生。

综上所述, GnRH 激动剂和经血源性干细胞联合治疗可能通过 PI3K-Akt 信号通路表达升高, 减少闭锁卵泡的产生, 提高小鼠卵巢的储备功能, 从而达到对卵巢修复和保护的目的。

参考文献:

- [1] 陈子江. 生殖内分泌学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 335-43.
- [2] 赵淑颖, 郭广玲, 刘晨晨, 等. 干细胞移植治疗卵巢早衰: 基于 13 篇动物实验的 Meta 分析[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(25): 4084-92.
- [3] 刘思旋, 李晓林, 陈 璇, 等. 环磷酰胺辅助化疗对不同年龄乳腺癌患者卵巢功能的损伤情况及机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(5): 850-6.
- [4] 张秀娟, 张瑞红, 郝 晶, 等. 外泌体及其 miRNA 治疗化疗所致早发性卵巢功能不全的研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2021, 30(5): 389-91.
- [5] 程洪斌, 王晓东, 杨 静, 等. 卵巢早衰细胞治疗临床前研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2020, 41(19): 2456-9.
- [6] 李仲康, 郑嘉华, 田彦鹏, 等. 间充质干细胞治疗卵巢早衰的最新进展及机制[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(1): 141-7.
- [7] Liu T, Huang Y, Zhang J, et al. Transplantation of human menstrual blood stem cells to treat premature ovarian failure in mouse model [J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(13): 1548-57.
- [8] 栾 旭, 芦小单, 米旭光, 等. 干细胞治疗早发性卵巢功能不全的研究进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2021, 41(11): 1031-5.
- [9] 陈丽玲, 孙秀丽. 促性腺激素释放激素激动剂对子宫内膜异位症合并不孕症患者性激素水平的影响[J]. 数理医药学杂志, 2021, 34(11): 1667-9.
- [10] Lai D, Wang F, Yao X, et al. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure [J]. J Transl Med, 2015, 13: 155.
- [11] 郝红燕, 张杨, 赵小莹, 等. 卵巢早衰病理机制最新研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(12): 103-6.

- [12] 铁雅楠, 王欣荣. 不同浓度的PMSG对小鼠子宫发育的影响[J]. 畜牧兽医杂志, 2021, 40(6): 56-9.
- [13] Blumenfeld Z, Avivi I, Eckman A, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist decreases chemotherapy-induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients with Hodgkin lymphoma[J]. Fertil Steril, 2008, 89(1): 166-73.
- [14] 肖苗苗, 刘磊, 易呈浩, 等. 促性腺激素释放激素类似物对绝经前乳腺癌化疗患者卵巢功能保护的疗效分析: 一项Meta分析[J]. 肿瘤, 2019, 39(2): 116-25.
- [15] 王丽娟, 梁晓磊, 杨永秀. 干细胞治疗卵巢早衰研究进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2021, 41(1): 85-8.
- [16] Wang Z, Wang Y, Yang T, et al. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 11.
- [17] 廖宝莹, 齐新宇, 乔杰, 等. 多囊卵巢综合征的啮齿类动物模型[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2021, 41(10): 948-55.
- [18] 韩昕宇, 冯晓玲, 吴天强, 等. 早发性卵巢功能不全与昼夜节律紊乱关系的中西医研究进展[J]. 中医药学报, 2021, 49(10): 110-5.
- [19] 杨骏杰, 赵世天, 赵永见, 等. 化瘀补肾方对卵巢切除小鼠骨折愈合的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(10): 1425-30.
- [20] Chen X, Wang Q, Li X, et al. Heat shock pretreatment of mesenchymal stem cells for inhibiting the apoptosis of ovarian granulosa cells enhanced the repair effect on chemotherapy-induced premature ovarian failure[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 240.
- [21] 袁丽芳, 黄伟育, 覃爱平, 等. 免疫抑制剂在卵巢功能保护应用中的研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2021, 30(1): 131-5.
- [22] 张毅敏, 于斌, 陈佳, 等. 针刺治疗对卵巢早衰大鼠PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J]. 中国针灸, 2015, 35(1): 53-8.
- [23] 顾燕频, 王荷丹, 刘玮, 等. 紫菀二仙汤对雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全大鼠卵巢结构与功能的影响[J]. 浙江中医杂志, 2020, 55(11): 790-2.
- [24] 杨珍, 魏茂林, 董晓英. 毓麟珠通过影响免疫性POI小鼠卵母细胞线粒体改善卵巢功能的研究[J]. 环球中医药, 2020, 13(11): 1846-52.
- [25] 史露露, 尚玉洁, 周惠芳. 内质网应激对卵巢的损伤及相关疾病研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(5): 73-6.
- [26] 曲晓力. AMH、LH、FSH、E2的水平与卵巢功能减退的相关性分析[J]. 中外女性健康研究, 2020, 6: 16-7, 19.
- [27] 陈震宇, 赵丽嫣. 细胞核增殖相关抗原ki67和bcl-2、bax与恶性卵巢上皮性肿瘤临床病理及预后的关系[J]. 实用妇产科杂志, 2004, 20(1): 25-8.
- [28] 河南省细胞生物学会干细胞专业委员会, 中国研究型医院学会临床数据与样本资源库专业委员会. 经血源子宫内膜干细胞资源库建立标准专家共识[J]. 新乡医学院学报, 2020, 37(9): 801-12.
- [29] Li S, Liu M, Ma H, et al. Ameliorative effect of recombinant human lactoferrin on the premature ovarian failure in rats after cyclophosphamide treatments[J]. Ovarian Res, 2021, 14(1): 17.
- [30] Kumawat KL, Kaushik DK, Goswami P, et al. Acute exposure to lead acetate activates microglia and induces subsequent by stander neuronal death via caspase-3 activation[J]. Neurotoxicology, 2014, 41: 143-53.
- [31] Qi D S, Tao J H, Zhang L Q, et al. Neuroprotection of cilostazol against ischemia/reperfusion induced cognitive deficits through inhibiting JNK3/caspase-3 by enhancing Akt1[J]. Brain Res, 2016, 1653: 67-74.

(编辑: 经媛)