

补肾调冲方含药血清对大鼠卵巢颗粒细胞增殖、激素分泌和 mRNA 表达的影响

夏 天¹, 韩 冰²

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300193

摘 要: **目的** 运用血清药理学方法观察补肾调冲方对大鼠卵巢颗粒细胞增殖、激素分泌功能以及抑制素 B (INHB)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) mRNA 表达的影响。**方法** 向培养的 SD 大鼠卵巢颗粒细胞中分别加入 10% 空白血清 (对照组)、人转基因重组促卵泡激素 (hFSH) 含药血清 (阳性对照组)、补肾调冲方含药血清 (补肾调冲方组), 培养 48 h, 以闪烁计数器测定 ³H-TdR 掺入 DNA 的量, 流式细胞仪测定细胞周期分布, 放射免疫法测定培养液中雌二醇 (E₂) 和孕激素 (P) 水平, 并采用 RT-PCR 法测定 INHB、IGF-1 mRNA 的表达量。**结果** 补肾调冲方含药血清可剂量相关地促进 ³H-TdR 掺入颗粒细胞 DNA 的量。与对照组相比, 补肾调冲方各含药血清组 G₀/G₁ 期细胞均明显减少, 而 S 期细胞则明显增多; E₂、P 的量明显升高; 颗粒细胞 INHB、IGF-1 mRNA 表达量均明显增多, 且呈剂量相关性。**结论** 补肾调冲方含药血清能明显促进卵巢颗粒细胞的增殖、增强甾体激素的分泌功能, 该作用可能通过增强 INHB、IGF-1 基因的表达, 从内分泌和自分泌两条途径调节卵巢功能而实现的。

关键词: 补肾调冲方; 血清药理学; 卵巢颗粒细胞; 抑制素 B; 胰岛素样生长因子-1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)05-0384-05

Effect of serum containing Bushen Tiaochong Recipe on proliferation, hormone secretion, and mRNA expression in ovarian granulosa cells of rats

XIA Tian¹, HAN Bing²

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

2. Second Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300150, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of serum containing Bushen Tiaochong Recipe (BTR) on rats ovarian granulosa cell proliferation, hormone secretion and inhibin B (INHB) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA expressions by the method of serum pharmacology. **Methods** Blank serum (10%), serum containing follicle-stimulating hormone (FSH) or increasing doses of BTR were added to 6-weeks-old Sprague Dawley rats to prepare the control, positive control, and serum containing BTR groups, in which granulosa cells were incubated for 48 h. [³H] Thymidine deoxyriboside (³H-TdR) incorporation with DNA assay was performed using a scintillation counter. Cell cycle analysis was carried out by flow cytometer. Levels of estradiol and progesterone were examined by radio-immunity. INHB and IGF-1 mRNA expressions were measured by the method of RT-PCR. **Results** There was a dose-dependent increase in ³H-TdR incorporation in granulosa cells in the serum containing BTR. DNA content assay exhibited BTR serum-treated cells in G₀/G₁ phase decreased markedly, while those in S phase increased significantly compared with the normal serum group. The levels of E₂ and P in BTR serum-treated groups were all significantly higher than those in the normal serum group. It showed that serum containing BTR increased more INHB and IGF-1 mRNA expressions in granulosa cells than those in the normal serum group with a dose-dependent manner. **Conclusion** Serum containing BTR could stimulate granulosa cells proliferation and steroid hormone secretion through promoting INHB and IGF-1 mRNA expressions in granulosa cells. This indicates serum containing BTR could regulate granulosa cells function through two different pathways of endocrine and autocrine.

Key words: Bushen Tiaochong Recipe; serum pharmacology; ovarian granulosa cell; inhibin B; insulin-like growth factor-1

收稿日期: 2011-06-09

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2005006)

作者简介: 夏 天, 副主任医师, 研究方向为生殖内分泌的中西医结合研究。Tel: (022)27432747 E-mail: xiatian1976@yahoo.com.cn

卵巢功能失调可致排卵功能障碍、黄体功能异常及内分泌紊乱等,从而引起月经紊乱、闭经、不孕症、卵巢早衰等多种妇科疾病,并可影响到其他脏器的生理功能。目前西医对卵巢功能的调节主要依靠激素替代、促排卵等手段,但存在许多不良反应。中药有多系统、多环节、多靶点的整体调节作用,且不良反应少,在调节卵巢功能方面具有西医所不可比拟的优势。韩冰教授在中医学“肾主生殖”、“冲任学说”理论基础上,以补肾调冲为治疗原则,选取菟丝子、黄精、熟地、肉苁蓉、巴戟天、当归、川芎、紫石英、五味子等中药组成补肾调冲方,适用于肾虚、冲任失调所致的卵巢功能失调性疾患,如月经不调、卵巢早衰、不孕症等。临床研究表明,该方可恢复卵巢早衰患者的月经周期,改善围绝经期症状,纠正血清高促性腺激素低雌激素状态,总有效率高达93%^[1]。体外药理实验显示,该药可促进颗粒细胞增殖,减少细胞凋亡的发生,提高细胞内环腺苷酸水平,并可上调卵泡刺激素受体(FSHR)及类固醇激素合成急性调节蛋白(StAR)mRNA的表达。补肾调冲方还可拮抗高雄激素对颗粒细胞的增殖及甾体激素分泌功能的抑制作用^[2-4]。本研究运用血清药理学方法,进一步观察补肾调冲方含药血清对体外培养的大鼠卵巢颗粒细胞增殖和激素分泌功能、抑制素B(inhibin B, INHB)以及胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)mRNA表达的影响,为该药在临床上的推广应用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

瑞典LKB—Wallace 1215 Rackbeta I液闪计数器;EPICS ALTRA型流式细胞仪(美国Beckman & Coulter公司)。

1.2 试药与试剂

补肾调冲方由菟丝子、黄精、熟地、肉苁蓉、巴戟天、当归、川芎、紫石英、五味子组成,水煎2次,混合2次煎液,浓缩,得该方浓缩液,相当于生药1 g/mL,由天津中医药大学第一附属医院药剂科提供。

人转基因重组促卵泡生成素(hFSH,批号F4021,7 000 U/mg)、孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)均购自美国Sigma公司;DMEM—F12培养基(批号1006274)、青霉素-链霉素溶液(批号524)、小牛血清(批号

16050-122)均购自美国Gibco BRL公司;LightCycler SYBR Green I RNA一步法扩增试剂盒和LightCycler质控盒均购自德国Roche公司;PMSG试剂盒、雌二醇(E₂)试剂盒、孕激素(P)试剂盒均购自德国Roche公司。

1.3 动物

健康雌性SD大鼠,共25只,6周龄,体质量(150±20)g;21~25日龄未成年雌性SD大鼠,10只,体质量(60±10)g。均由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,使用许可证:SCXK(军)2002-001。

2 方法

2.1 含药血清和正常血清的制备

取25只6周龄雌性SD大鼠,随机分为5组,每组5只,对照组大鼠每日ig生理盐水0.03 mL/g;补肾调冲方组高、中、低剂量组大鼠每日ig补肾调冲方浓缩液30、20、10 mg/g(分别相当于成人剂量的6、12、18倍),每日分2次给药,连续给药3 d,第4天1次ig全天剂量(根据中医临床用药习惯和药动学的“平均稳态浓度”,每日分2次口服,用药一般3~4剂,药物即可达到平均稳态浓度,又能看到其明显的疗效,此时采血制备含药血清为妥);阳性对照组大鼠每日sc hFSH 7.8 mU/g,每日分2次给药,连续给药4 d。各组均于末次给药后1 h大鼠股动脉采血,分离血清,将每组血清混匀,以0.22 μm滤器抽滤除菌,56℃灭活,分装,-20℃保存备用。

2.2 卵巢颗粒细胞的制备

取10只21~25日龄未成年雌性SD大鼠,sc PMSG 66 U/只,48 h后断头处死。在无菌条件下立即取出卵巢,刺破其表面的成熟卵泡,使颗粒细胞释放入冰冷的DMEM培养液中,滤过后离心,收集细胞,用培养液洗2次后加入DMEM—F12培养液(含20%小牛血清+1%青霉素-链霉素)重悬细胞,0.4%台盼蓝染色计数。将细胞植入24孔培养板中(培养板孔内预先涂布多聚赖氨酸),每孔含细胞 3.0×10^5 /mL,在37℃、5%CO₂培养箱中预培养24 h。

2.3 细胞培养及分组

在预实验中,分别向卵巢颗粒细胞培养体系中加入5%、10%、20%的含药血清,结果显示添加10%的含药血清更能促进颗粒细胞的增殖及甾体激素分泌,故在正式实验中选择10%含药血清。

颗粒细胞预培养 24 h 后分成 5 组换液, 每组于含 2% 小牛血清的细胞培养液中分别加入 10% 的补肾调冲方高、中、低剂量组含药血清、hFSH 含药血清、对照组血清。每组设 6 个复孔, 继续培养 48 h。

2.4 ^3H -TdR 掺入 DNA 测定

细胞培养结束前 6 h 加 ^3H -TdR 37 MBq/mL, 使培养液中 ^3H -TdR 的终浓度为 0.074 MBq/mL。收样时弃去全部培养基, 细胞用冷 PBS 洗 3 次, 洗涤后加 NaOH 溶解细胞, 室温下放置 20 min 后收样于液闪瓶中, 避光放置 24 h, 在液体闪烁计数仪上行放射活性计数 (每 1×10^5 细胞) 测定。

2.5 颗粒细胞 DNA 量的测定

采用碘化丙锭 (PI) 综合染液做细胞 DNA “一步法” 染色, 每份细胞样品调至 1×10^6 /mL, 4 ℃ 染色 30 min 后用流式细胞仪测定细胞周期的分布和细胞增殖指数 (PI)。

$$\text{PI} = \text{S} + \text{G}_2\text{M} / (\text{G}_0\text{G}_1 + \text{S} + \text{G}_2\text{M})$$

2.6 颗粒细胞培养液中 E_2 和 P 水平的测定

采用放免法测定, E_2 试剂盒的灵敏度 ≤ 5 pg/mL, 孕激素试剂盒的灵敏度 ≤ 0.2 ng/mL。两者的批内 RSD 均小于 10%, 批间 RSD 均小于 15%, 符合质量控制标准要求。

2.7 INHB、IGF-1 mRNA 表达水平的检测

2.7.1 引物设计 INHB、IGF-1 和 GAPDH 基因的引物设计采用软件 GeneRunner, 根据 GenBank 所发布的目的基因序列进行设计, 由北京奥科生物技术公司负责合成。INHB 引物序列正向: 5'-GGATGCCCCACATCTGATCTG-3', 反向: 5'-GACCTCATGCTCCCTGGTAG-3', 片段大小为 251 bp; IGF-1 引物序列正向: 5'-GCATTGTGGATGAGTGTTC-3', 反向: 5'-GGCTCCTCCTACATTCGTGA-3', 片段大小为 121bp; GAPDH 引物序列为正向: 5'-TGGAGTCTACTGGCGTCTTC-3', 反向: 5'-TTCACACCCATCACAAACATG-3', 片段大小为 121 bp。

2.7.2 cDNA 的 PCR 扩增反应 取各组卵巢总 RNA 各 1 μg 分别逆转录合成 cDNA, 进行 PCR 反应, 分别扩增 GDF-9、AMH、GAPDH 基因 (反应体系: 10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物 1 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 含 MgCl_2 2.5 μL 、重蒸水 14.5 μL 、cDNA template 2 μL 、*Taq* DNA 聚合酶 2 μL 的 10 $\times$ *Taq* 缓冲液), 扩增条件: 95 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃、30 s, 48~58 ℃、30 s (于 PCR

仪上进行以确定不同靶基因最适的退火温度), 72 ℃、30 s, 进行 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以检测扩增产物的特异性, 并选取不同基因的特异性扩增产物进行 DNA 序列分析。

2.7.3 RT-PCR 检测卵巢组织 INHB 和 IGF-1 mRNA 水平 目的基因及内参照基因 (GAPDH) 均采用相对定量, 各基因的相对表达水平以 $2^{-\Delta C_t}$ 来表示 (ΔC_t = 内参照基因 C_t 值 - 待测基因 C_t 值)。用于定量检测的荧光染料为 SYBR®Green, 反应体系包括上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , DNA 模板 5 μL , 2 $\times$ SYBR Green PCR 混合液 12.5 μL , 重蒸水 5.5 μL 。循环参数: 95 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃、10 s, 56 ℃、10 s, 72 ℃、10 s, 进行 40 个循环。温度变化速度为 20 ℃/s, 在每个循环的延伸末检测荧光信号。随后是一个缓慢升温的程序: 95 ℃、10 s, 65 ℃、15 s, 95 ℃、10 s, 但温度变化速度为 0.1 ℃/s, 同时连续监测双链 DNA 逐渐变性过程中荧光信号的变化情况, 绘制 PCR 产物的溶解曲线, 以了解样品扩增的特异性, 保证测定结果的准确、可靠。

2.8 统计学方法

所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件包, 组间比较用单因素方差分析法 (One-way ANOVA) 进行统计分析。

3 结果

3.1 对颗粒细胞 ^3H -TdR 掺入的影响

补肾调冲方含药血清可明显促进颗粒细胞 ^3H -TdR 的掺入, 其中高、中剂量组 ^3H -TdR 的掺入量分别是对照组的 1.85、1.58 倍, 两组与 hFSH 含药血清组的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 低剂量含药血清组与对照组之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。结果表明补肾调冲方和 hFSH 含药血清可促进卵巢颗粒细胞 DNA 的合成。

3.2 对颗粒细胞细胞周期的影响

补肾调冲方高、中剂量组与对照组比较, G_0/G_1 期细胞数明显减少, 而 S 期细胞明显增多, 表明补肾调冲方含药血清可促使颗粒细胞由 G_0/G_1 期向 S 期转化, 且 PI 指数均明显增高 ($P < 0.05$); 与 hFSH 含药血清组比较, 3 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而补肾调冲方低剂量含药血清组的促细胞增殖作用不如其高、中剂量组明显, 见表 2。结果表明补肾调冲方含药血清可促使颗粒细胞由 G_0/G_1 期

表 1 补肾调冲方含药血清对颗粒细胞 ³H-TdR 掺入的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of serum containing BTR on ³H-TdR incorporation in granulosa cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组 别	剂量/(mg·g ⁻¹)	掺入量/cpm	掺入率/%
对照	—	629±165	100
补肾调冲方	30	1 164±436**	185
	20	993±370*	158
	10	886±294	140
hFSH	7.8 mU·g ⁻¹	1 208±589	192

与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01

P*<0.05 *P*<0.01 vs control group

向 S 期转化, 从而促进颗粒细胞的增殖。

3.3 对颗粒细胞分泌 E₂、P 的影响

各含药血清均能明显促进卵巢颗粒细胞甾体激素的分泌, 其中以补肾调冲方高剂量含药血清组和

hFSH 含药血清组激素增高最为明显, 且两者之间差异无统计学意义 (*P*>0.05)。补肾调冲方高、中剂量含药血清组之间 E₂、P 水平差异亦无统计学意义 (*P*>0.05), 而高、低剂量血清组之间差异则有显著性 (*P*<0.05), 见表 2。表明补肾调冲方含药血清能促进卵巢颗粒细胞基础状态下 E₂、P 的合成与分泌能力, 且有一定的量效关系。

3.4 对颗粒细胞 INHB、IGF-1 mRNA 表达的影响

与对照组比较, 各含药血清组 INHB、IGF-1 mRNA 的表达量均明显增高, 并呈剂量相关性; 与 hFSH 组比较, 补肾调冲方高、中剂量组 INHB、IGF-1 mRNA 的表达量与之差异均无显著性 (*P*>0.05), 补肾调冲方低剂量组与之差异有显著性或非常显著性 (*P*<0.05、0.01), 见表 3。

表 2 补肾调冲方含药血清对颗粒细胞细胞周期分布及 E₂、P 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of serum containing BTR on cell cycle, and secretion of E₂, P in granulosa cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组 别	剂量/(mg·g ⁻¹)	细胞周期/%			PI/%	E ₂ /(mol·L ⁻¹)	P/(mol·L ⁻¹)
		G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期			
对照	—	74.0±2.4	14.9±1.9	12.2±1.6	27.3±2.0	3.97±0.61	3.43±0.72
补肾调冲方	30	61.9±3.1*	22.8±3.7*	15.3±2.6	37.0±3.0*	11.08±1.13**	7.01±1.17**
	20	65.6±3.9*	19.9±2.8*	14.5±2.5	35.6±3.9*	10.20±1.08**	6.09±0.91**
	10	68.4±5.7 ^Δ	18.0±4.5	13.6±3.4	31.0±3.6	8.91±1.02** ^Δ	5.64±0.56**
hFSH	7.8 mU·g ⁻¹	62.7±3.6	20.2±3.6	17.1±3.4	37.8±3.8	11.30±1.44	6.30±0.86

与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01; 与 hFSH 含药血清组比较: ^Δ*P*<0.05

P*<0.05 *P*<0.01 vs control group; ^Δ*P*<0.05 vs serum containing hFSH group

表 3 补肾调冲方含药血清对颗粒细胞细胞 INHB、IGF-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of serum containing BTR on INHB and IGF-1 mRNA expression in granulosa cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组 别	剂量/(mg·g ⁻¹)	INHB/2Δ ^{Ct}	IGF-1/2Δ ^{Ct}
对照	—	0.339±0.027	0.210±0.019
补肾调冲方	30	0.528±0.041**	0.476±0.022**
	20	0.495±0.036**	0.441±0.039**
	10	0.430±0.294* ^{ΔΔ}	0.382±0.030* ^Δ
hFSH	7.8 mU·g ⁻¹	0.579±0.047	0.513±0.025

与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01

与 hFSH 血清组比较: ^Δ*P*<0.05 ^{ΔΔ}*P*<0.01

P*<0.05 *P*<0.01 vs control group

^Δ*P*<0.05 ^{ΔΔ}*P*<0.01 vs serum containing hFSH group

4 讨论

本实验采用中药血清药理学方法, 模拟补肾调冲方在实验动物体内的真实作用, 观察其在机体内

形成的代谢产物及其诱生的机体内源性物质对体外培养的卵巢颗粒细胞功能的影响, 摒弃了补肾调冲方本身的理化性质对实验结果的干扰, 从而更能体现其促进大鼠卵巢颗粒细胞功能的整体药理效应。

在生理条件下, 卵巢功能受垂体促性腺激素的调控, 其中 FSH 是刺激卵泡发育最重要的激素。FSH 能促使窦前卵泡及窦状卵泡的颗粒细胞的增殖与分化, 分泌卵泡液, 以促进卵细胞的生长发育、成熟。本研究用 hFSH 作为阳性对照, 观察补肾调冲方对颗粒细胞增殖与激素分泌的影响。³H-TdR 掺入结果显示, 补肾调冲方与 hFSH 含药血清均可促进卵巢颗粒细胞 DNA 的合成, 且补肾调冲方高、中剂量含药血清作用与 hFSH 含药血清比较差异无显著性。细胞增殖动力学研究中, G₀/G₁ 期细胞为静止期细胞, S 期细胞为增殖期细胞, S+G₂/M 期在细胞周期中所占比例 (PI) 反映了细胞增殖和分化状态。本研究通过流式细胞术检测发现补肾调冲方含药血

清可促进卵巢颗粒细胞由 G₀ 期向 S 期和 G₂/M 期转化, 从而促进细胞的增殖, 且其作用随剂量增加而增强。另外, 补肾调冲方含药血清还可明显促进颗粒细胞 E₂、P 的分泌 (呈剂量相关性), 其中大剂量组与 hFSH 血清组作用相似。以上结果表明补肾调冲方含药血清具有促进体外培养的卵巢颗粒细胞增殖与分泌功能的作用。

INHB 是转化生长因子 β (TGF- β) 超家族成员之一, 也是卵巢局部调节因子网络中的重要成员, 通过调节 FSH 的合成分泌来影响卵巢的排卵及分泌功能。INHB 是 FSH 的重要抑制因子, 可能经与激活素 (ACT) 结合而抑制 FSH 活性。离体实验证明, 敲除小鼠激活素 II 型 β 受体, 卵泡发育受阻于早期阶段^[5]。临床研究发现, 卵巢早衰患者血 INHA 和 INHB 均明显低于正常妇女, 而 INH α 基因第 2 外显子内 769 G-A 变异可能与卵巢早衰有关^[6]。一项前瞻性研究显示, INHB 对外源性 FSH 的反应性与体外受精—胚胎移植患者窦卵泡数及获卵数有明显相关性^[7]。IGF-1 是卵巢局部调节系统中重要的旁分泌生长 / 分化因子, 参与调节卵泡膜细胞和颗粒细胞的 DNA 合成、甾体激素生成、芳香化酶活性、促性腺激素受体生成等。体外研究发现 IGF-1 可明显促进卵巢颗粒细胞的增殖与分化, 且可增强 FSH 与 FSHR 的结合力; 而 FSH 亦可促进颗粒细胞 IGF-1 的合成, 该作用被 E₂ 所增强。本研究结果表明, 补肾调冲方和 hFSH 含药血清均可促进卵巢颗粒细胞 INHB、IGF-1 mRNA 的表达, 且前者的作用呈剂量相关性, 推测补肾调冲方含药血清可通过促进 INHB、IGF-1 mRNA 的表达, 增强颗粒细胞的增殖与甾体激素的分泌功能, 而从内分泌及自分泌两条途径发挥其调节卵巢功能的作用。

中医学认为肾为先天之本, 元气之根, 既藏先天之精, 又藏后天之精, 为生殖发育之源。而“冲为血海”, “任主胞胎”, 冲任通盛, 方能促使月经的来潮和孕育的正常。冲任二脉受肾气的调控, 又可

以反过来影响肾的功能, 与肾共同主持女性的生殖机能, 调节性腺轴的功能。本研究通过离体实验方法, 观察到补肾调冲方可明显促进体外培养的大鼠卵巢颗粒细胞增殖与甾体激素分泌的功能, 结合以往补肾调冲方的临床研究及整体动物实验结果, 证实补肾调冲方具有促卵泡发育、排卵、甾体激素分泌的功能, 从而为“肾主生殖”、“冲任学说”等中医理论提供了新的客观指标和理论依据。

参考文献

- [1] 高 慧, 夏 天, 韩 冰, 等. 中药补肾调冲方治疗卵巢早衰的临床研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(11): 1557-1559.
- [2] Xia T, Luo S P, Fu Y, *et al.* Effects of the serum contained Bushen Tiaochong Recipe on rats ovarian granulosa cell proliferation, steroidogenesis and associated gene expression [J]. *Chin J Integr Tradit Med*, 2007, 13(3): 67-73.
- [3] 夏 天, 韩 冰, 侯莉莉. 补肾调冲方含药血清对高雄激素培养的卵巢颗粒细胞增殖与分泌的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(4): 351-354.
- [4] 李沛霖, 侯莉莉, 杜永红. 补肾调冲含药血清对大鼠卵巢颗粒细胞体外分泌功能的影响 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 354-355.
- [5] Welt C, Sidis Y, Keutmann H, *et al.* Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium [J]. *Exp Biol Med*, 2002, 27(9): 724-752.
- [6] Shelling A N, Burton K A, Chand A L, *et al.* Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(12): 2644-2649.
- [7] Yong P Y, Baird D T, Thong K J, *et al.* Prospective analysis of the relationships between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(1): 35-44.