

• 实验研究 •

滋阴补阳序贯中药对光照损伤大鼠卵巢
基因表达谱的影响邹奕洁¹ 谈 勇^{1*} 王育良² 堵 吉¹ 董星丽¹

(1. 南京中医药大学, 江苏省南京市汉中路 155 号, 210029; 2. 南京中医药大学附属江苏省中医院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873283)

* 通讯作者: xijun1025@163.com, 13951942495

[摘要] 目的 探讨光照对大鼠卵巢功能的影响及滋阴补阳序贯中药对卵巢结构和功能的调节机制。方法 采用人工光环境建立大鼠生殖节律失调模型。30 只大鼠随机分为空白组、模型组和中药组各 10 只, 中药组采用滋阴方与补阳方序贯给药, 给药剂量为 1ml/100g, 模型组和空白组给予等量生理盐水, 各组连续灌胃 18 d。抽提各组大鼠卵巢组织的总 RNA, 经逆转录分别用 Cy3、Cy5 荧光标记, 获得各组大鼠卵巢 cDNA 的探针, 再与 cDNA 基因表达谱芯片杂交, 结果由激光扫描仪扫描并进行 Ratio 值分析、聚类分析。结果 聚类分析结果显示, 中药组基因谱与模型组的表达差异较大。模型组 VS 空白组的差异表达基因 1896 条, 下调 1065 条, 上调 831 条; 中药组 VS 模型组的差异表达基因 2582 条, 下调 1325 条, 上调 1257 条。1067 个差异基因的偏差得到调整, 其中 611 个基因表达增加, 456 个基因表达下降。差异表达基因的生物学过程结合 pathway 分析结果表明, 中药组对黄体生成素受体、褪黑素受体等通路的基因网络表达调控作用明显。结论 滋阴补阳序贯中药可能通过调节细胞增殖、抗凋亡以及甾体激素合成代谢过程等环节部分解除光照致生殖节律紊乱, 从而改善卵巢功能。

[关键词] 滋阴补阳; 序贯给药; 光照损伤; 卵巢; 基因表达谱

Effect of Sequential Yin-Nourishing Yang-Supplementing Medicinal on Ovarian Gene Expression Profiles in Light Damaged Rats

ZOU Yijie¹, TAN Yong¹, WANG Yuliang², DU Ji¹, TONG Xingli¹

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province 210029; 2. Jiangsu Province Hospital of TCM, Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM)

ABSTRACT **Objective** To study the effect and mechanism of sequential yin-nourishing yang-supplementing medicinal on ovarian differential gene expression in rats with reproductive rhythm disorders under artificial light environment. **Methods** The rat models of reproductive rhythm disorders were established under artificial light environment. Thirty rats were randomized into the blank group, model group and Chinese medicinal group, with 10 in each. The Chinese medicinal group was sequentially administered with 1 ml/100 g yin-nourishing formula and yang-supplementing formula. The model group and blank group were gavaged with same volume of normal saline. The intragastric administration lasted for 18 days in each group. The total RNA in ovarian tissue of rats was extracted with one-step method and fluorescence labeled with Cy3 and Cy5 after reverse transcription. The ovarian cDNA probes of rats in each group were got and then hybridized with cDNA microarray. The results were scanned with laser scanner and the Ratio analysis and cluster analysis was conducted with software. **Results** Cluster analysis showed that the genetic profile in the Chinese medicinal group and model group was quite different. There were 1896 differentially expressed genes (1065 down-regulating genes and 831 up-regulating genes) as the model group compared with normal group. There were 2582 differentially expressed genes (1325 down-regulating genes and 1257 up-regulating genes) as the Chinese medicinal group compared with model group. The deviation of 1067 differentially expressed genes had been adjusted with increased expression in 611 genes and decreased expression in 456 genes. Differentially expressed genes in biological processes and pathway analysis showed that the regulation of Chinese medicinal on the genetic network expression of luteinizing hormone (LH) receptor and melatonin (MT) receptor was obvious. **Conclusion** The sequential yin-nourishing yang-supplementing medicinal can partially alleviate light-induced reproductive rhythm disorders and improve ovarian function by regulating cell proliferation and inhibiting apoptosis and the anabolism of steroids.

Keywords sequential yin-nourishing yang-supplementing medicinal; yin-nourishing formula; yang-supplementing formula; light damage; ovarian; gene expression profiles

光环境改变对生物节律的影响是目前生命科学研究的热点和前沿问题,外源性光信号(如光谱变化、昼夜明暗变化、光强弱变化等)对生物节律的影响已引起广泛关注^[1-2]。光照信号节律改变如日夜节律紊乱可导致褪黑素(MT)水平降低,从而可能导致或加重失眠症、阿尔海默病、大肠癌、乳腺癌等^[3-4],育龄妇女的月经紊乱、痛经、经前紧张综合征等患病几率明显上升^[5],自然流产、妊娠高血压综合征的风险均增加^[6],其根源均与MT水平降低有关。前期研究^[7]发现,人工光环境下大鼠动情周期缩短、紊乱,卵巢呈多囊样改变,雄激素升高,给予益肾滋阴、温肾补阳的中药序贯治疗后动情周期有所恢复,雄激素下降。为从基因水平进一步研究人工光环境下卵巢的病理变化及滋阴补阳中药的治疗机理,我们利用基因芯片技术进行了探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

21日龄SD雌性大鼠30只,体重49~51g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005,饲养于南京中医药大学实验动物中心无特殊病原菌(SPF)级屏障系统。室温22~24℃,空气湿度55%~70%。大鼠可自主摄取标准颗粒饲料及饮水。

1.2 实验药物

滋阴方药物组成:当归、白芍、菟丝子、生地黄、山萸肉、鳖甲等各10g;补阳方药物组成:续断、山药、巴戟天、淫羊藿、紫石英等各10g。常规煎煮、滤渣,剂量按人和大鼠体表面积折算的等效比率1:0.018计算得出,浓缩成生药量为1g/ml的水煎剂,4℃保存备用。

1.3 模型的建立

参考文献^[2,8-9]模拟城市普通室内光环境,大鼠饲养在光照控制箱内,箱高1.5m,箱顶安装普通居民用市售日光灯4只,40W,照度为533+16LUX,24h持续照明。大鼠自3周断乳时开始观察阴门开启情况,阴门开启后每日上午8:30~9:00作阴道脱落细胞涂片镜检,每日1次。动态观察阴道脱落细胞学变化趋势,动情周期的紊乱是反映性激素代谢失调的敏感指标,若阴道涂片显示动情周期紊乱、动情间期延长或缩短,则为模型成功。

1.4 动物分组及给药

适应性饲养2天后采用随机数字表法分为空白组、模型组和中药组各10只。模型组和中药组建立光照损伤模型,空白组为正常光照周期,即光照:黑

暗=1:1。持续光照4周后,中药组服用滋阴补阳序贯中药,根据阴道脱落细胞涂片结果,确定给药大鼠所处动情时期:动情前期及动情期服用滋阴方,动情后期及动情间期服用补阳方。若连续服用滋阴方3天以上仍未进入动情后期/动情间期,则自动予以补阳方,同理,若连续服用补阳方3天以上仍未进入动情前期/动情期,则自动予以滋阴方。每日上午灌胃1次,连续灌胃18天,给药剂量为1ml/100g。模型组与空白组每天给予生理盐水1ml/100g。

1.5 基因检测

各组大鼠灌胃18天后处死,开腹取卵巢,在冰盒上分离卵巢及周围组织,置液氮中保存,由上海康成生物工程有限公司进行Roche-NimbleGen全基因组表达谱芯片测试以及realtime-PCR验证,芯片名称为Rattus norvegicus 12×135Karray。图像扫描及数据处理用Genepix4000B Scanner扫描芯片,以NimbleScan software(version 2.5, Roche)读取原始数据(rawintensity),并进行背景值修正和分位数标准化处理(Normalized),将标准化后的数据导入GenespringGX(Agilent version 10.0),比较两组样品之间Normalized值,计算Foldchange。Foldchange≥2的基因为表达显著上调基因, Foldchange≤0.5为表达显著下调基因。

2 结果

2.1 各组聚类结果

按照层次聚类(hierarchical)的分析方法,根据样本表达谱的相似性将样本划分为不同的组别,以反映各组基因表达的亲远关系。聚类分析结果显示,中药组基因谱与模型组的表达差异较大。

2.2 各组差异表达基因谱结果

根据基因芯片的荧光强度而获得的差异表达基因,是分别将模型组VS空白组、中药组VS模型组进行比较。其中模型组VS空白组的差异表达基因1896条,下调1065条,上调831条;中药组VS模型组的差异表达基因2582条,下调1325条,上调1257条。将以上总结出的两组差异表达基因进行比较,找出目标基因(即“纠偏基因”:是指造模后出现部分基因表达偏移并在经过治疗后得到纠正的这部分基因)。通过上述比较,目标基因1067条,下调456条,上调611条。为进一步对目标基因归类分析,参考Gene Ontology(www.geneontology.org),分为生物学过程、细胞组分、分子功能3个部分,并结合前期实验结果^[7]重点对生物学过程进行分析,结果见表1、表2。

表 1 光照损伤模型大鼠经中药治疗后表达趋于正常的基因(上调部分)

功能分类	基因数	基因符号	基因功能
能量和物质代谢	25	EHHADH//ACSM3//RGD1564463//PEMT//ANG1//ALOX12//CYP17A1//SDR42E1//LRAT//ALOX15B//RBP2//P2RX7//GD-PD2 等	精氨酸、脂质、脂肪酸、不饱和脂肪酸等代谢过程
生殖\交配	22	P2RY1//ADA//DMC1//PGR//LOC503283//FOXJ1//MAK//SPATA18//DNAJB13//SPAG6//MYCBPAP//PPP2R2B//MUC1//CLDN4 等	交配、生殖过程
节律	8	NPAS2//ADA//HNF1B//NPAS2//CLDN4//DMC1//PGR//ERBB3	节律行为、昼夜节律、昼夜行为、睡眠-觉醒周期节律等
微管系统	3	RSPH4A//RSPH9//TPPP3	微管束形成
激素合成\代谢	16	PRKCZ//MAPK15//MUC4//ERBB2//CLDN4//AHSG//PGR//PRSS8//ASS1//CD24//ABC1B1//FOXJ1//KRT19//CYP17A1//RBP2//LRAT	调节机体对类固醇刺激反应、细胞的激素代谢过程
离子转运及离子通道	17	P2RX7//KCNK1//SLC38A4//SLC38A3//SLC17A3//TMPSR8//SLC13A4//ATP2C2//ATP2B2//ATP7B//TRPM6 等	阴离子、阳离子的转运
细胞增殖	29	KNR1//ANG1//CD24//PRKCZ//ALOX12//T//PAX2//RAB25//CNTFR//CRIP2//FGFBP1//KLF5//PEMT//ALOX15B//IRF6//NOX4//ADA//P2RX//MMP7//FOXJ1//HBEGF//GCA//HNF1B//PGR//FGF16//AURKB//AIM1//LRP2//GNAT1//FOXJ1//RNF128	调节细胞增殖,调节细胞因子生物合成过程
免疫调节	20	P2RX7//LBP//ADA//MLF1//CD24//FOXJ1//MUC4//GPX2//OAS1A//OAS1K//CXCL13//CRIP2//CEBPE//THPO//DYRK3//IL12RB2//ASS1//GPX2//AHSG//CFB	调节 T 细胞介导的细胞毒性、抗原刺激的炎症反应、急性炎症反应、免疫反应过程
生长发育调节	71	PPP2R2B//ATP2B2//P2RY1//P2RX7//NOX4//ANG1//CDKL1//KLF5//DMC1//PGR//T//PAX2//EPCAM//ARG2//SALL1//ADA//HOXA2//PRSS8//HNF1B//ASS1//SEMA4G//TP73 等	生长发育过程

表 2 光照损伤模型大鼠经中药治疗后表达趋于正常的基因(下调部分)

功能分类	基因数	基因符号	基因功能
生殖、妊娠过程	18	FOXJ2//MMP2//PDGFRA//FST//BCL2L11//ABCG2//HS3ST5//TGFB3//GPX3//LIF//ATP7A//OSR1//AR//SMAD3//CIT-ED2//RLN1 等	生殖过程、生殖发育、雌性配子发生等
性腺发育	7	FOXJ2//MMP2//PDGFRA//AR//BCL2L11//FST//OSR1	卵巢发育、雌性第一性征发育
免疫反应	22	BCL2L11//CD36//FST//SMAD3//CCL19//LIF//TIMP1//LOC687079//VNN1//IL18//ATP7A//EFNB1//LRRC17//FIGF//F2R//KL//CELA1//CYP4F5//CD36//FIGF 等	参与炎症反应、免疫应答,调节免疫反应,调节免疫反应过程中的细胞因子产生,调节白细胞活性等
应激反应	27	SEMA4C//MMP2//MMP12//CITED2//NPPC//SMAD3//TGFB3//IL18//COTL1//FIGF//CD36//F2R//VNN1//KL//FABP4//EYA1//CELA1//CYP4F5//CYGB//OSR1//SLC23A2//GPX3//TRPA1//ATP7A//TIMP1//PDGFRA//NMU	调节缺氧反应,调节氧化应激反应、活性氧反应等
凋亡	18	BCL2L11//ATP7A//SMAD3//PARM1//VAV3//GULP1//FOXJ2//CITED2//VNN1//C7//TGFB3//F2R//MMD2//MMP2//TIMP1//OSR1//EYA1//IL18	调节细胞死亡、细胞凋亡
细胞因子、细胞增殖	6	F2R//IL18//SMAD3//CD36//FIGF//FABP4	调节细胞增殖与细胞活化,调节细胞因子生物合成过程
细胞迁移、黏附、定位	15	EFNB1//PDGFRA//F2R//SMAD3//CITED2//VASH1//FIGF//CTHRC1//VAV3//MMP2 等	细胞的交流,细胞迁移,细胞基质黏附
转录调节	14	CITED2//PKIA//SNAIL//FST//FOXJ2//SMAD3//AR//CELA1//LIF//RHOQ//BMP3//TGFB3//RUNX1//CREBBP	调节 RNA 聚合酶 II 启动子、基因独特性转录调节
排卵过程	5	FOXJ2//MMP2//CCNE1//PDGFRA//TGFB3//FST	排卵及排卵周期
雌激素代谢、激素刺激反应	12	RHOQ//TGFB3//PDGFRA//CD36//AR//TIMP1//MMP2//ABCG2//FABP4//GPX3//STEAP2//CYP1B1	调节机体对雌激素刺激的反应、调节雌激素代谢
其他	20	F2R//TGFB3//SEMA4C//AR//CD36//LIF//RHOQ//KL//FIGF//CILP//PDGFRA//EFNB1//IL18//MMP2//CITED2//THBS1//CD36//VASH1	血管发生、信号通路等

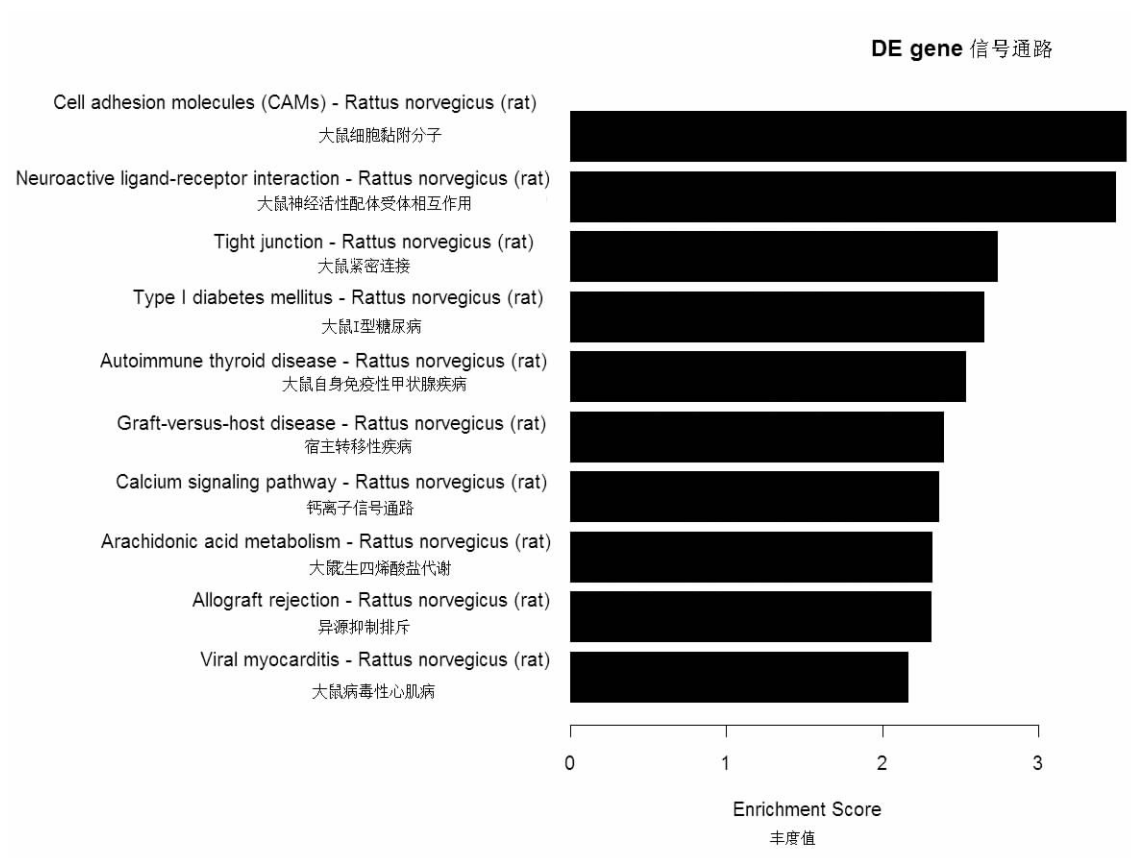


图 1 中药组上调的主要信号通路(排序前 10)

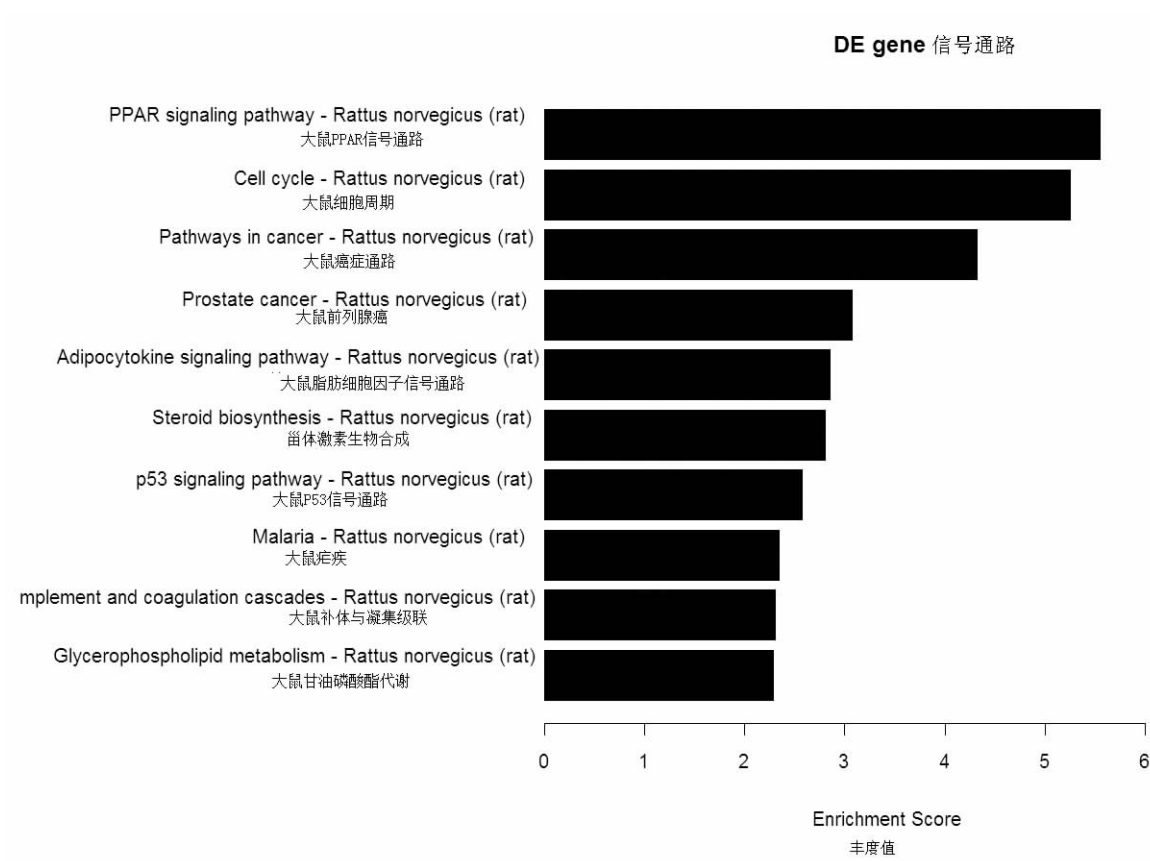


图 2 中药组下调的主要信号通路(排序前 10)

2.3 差异基因的信号通路

中药治疗后的差异基因涉及多64个不同的信号通路,如细胞黏附分子、PPAR、P53、神经活性配体受体相互作用、紧密连接、钙离子通道、甾体激素合成等。根据变异倍数丰度对这些信号通路进行排序,结果见图1、图2。

3 讨论

社会发展及技术进步深刻改变了人类的生活方式,日落而息的规律被夜读晚睡的习惯所代替,白天则被各种环境光源包围着。大量的人造光源与自然光在光谱上存在很大差异,光照时间和节律的改变可能造成“光照损伤”,对人类的生物节律产生极大的影响。随着不断深入研究发现,人体除了外眼直接感受光的节律变化,还存在多个间接的感光效应靶器官受生物钟系统调控,其中包括生殖系统^[9-11]。本研究旨在研究光照损伤对间接效应器官——卵巢的影响,观察生殖内分泌的改变,探讨滋阴补阳序贯中药对卵巢及其结构和功能的调节机理。

滋阴补阳序贯方药为江苏省中医院国家名老中医夏桂成教授所创,是治疗月经不调、多囊卵巢综合征等多种生殖内分泌疾病的经验方,经过近50年临床总结发现该中药不仅能有效的调整卵巢基础内分泌状态,对促发卵泡、健黄体、防止流产等方面均有显著疗效^[12-13]。滋阴方以归芍地黄汤为主体,功能补肾滋阴,养血填精;补阳方以毓麟珠为主体,功能温肾助阳,行气舒肝。本实验发现,中药组在性激素合成代谢方面对多个环节产生影响,如雄激素合成代谢过程中的多个关键酶表达下调,羟基固醇脱氢酶(17 β -HSD)、孕酮受体表达上调;因此,有理由推测该中药治疗后上调了细胞色素酶CYP17的表达,从而促进雄激素向下游的转化,上调了性激素结合球蛋白,促进了血清游离睾酮的结合,从而改善光照大鼠的高雄激素状态。

主导卵泡发育成熟是正常排卵的先决条件,表现为卵泡颗粒细胞增殖、卵泡液增多,卵泡膜细胞黄体生成素(LH)受体表达进一步增加,为接受垂体LH峰值脉冲做好准备。光照损伤造模的大鼠表现为血清LH明显增高,卵泡成熟度差,LH受体水平低,LH无法形成规律的峰值脉冲,无法启动卵泡排卵。而中药组基因表达谱显示,大鼠卵巢LH受体明显上调,从而可能阻遏发育中卵泡闭锁,对卵泡成熟发挥促进作用。除了LH外,还有很多促卵泡成熟的局部因子也参与了中药调节,如卵泡颗粒细胞

表达的卵泡抑素,其主要抑制垂体卵泡刺激素(FSH)分泌,并通过与Activin的 β 亚基相连阻断其与受体的作用,抑制Activin的生理作用^[14],从而调节卵泡的分化^[15]。本研究表明,持续光照可导致大鼠卵巢卵泡抑素上调,而中药下调其表达,从而阻遏卵泡闭锁,促进颗粒细胞增殖。

多项动物实验^[16-17]表明,MT可能是介导光信号对生殖系统影响的重要神经激素,它能调节动物生殖繁育。基因表达谱显示MT及其受体均无明显组间差异,但发现MT的前体-血清素的受体5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3a明显上调,可见中药可能在受体或前体水平发挥作用。另外,长期光照与恶性肿瘤特别是乳腺癌的高发也有直接关系,中药组可检测到乳腺癌基因breast cancer1、p53以及食道癌基因下调。这提示滋阴补阳中药促进细胞增殖的同时也有抑制癌基因表达的双向调节作用。

综上所述,滋阴补阳中药对人工光环境导致生殖节律失调大鼠有明显调整作用,其干预过程在多个靶点和环节、不同层次上都具有影响,可能是促进MT前体及受体表达后发挥MT生理作用的结果,也可能是中药对性激素合成代谢、促进细胞增殖活化,通过对内分泌、卵巢旁分泌、颗粒细胞自分泌等多途径发挥作用的结果,尚有待进一步研究来证实。

参考文献

- [1]夏凌,刘志民. 松果体褪黑素与下丘脑垂体肾上腺轴[J]. 上海医学,2009,32(2):163-165.
- [2]张网林,陈秋. 持续光照与松果体切除诱导大鼠脊柱侧凸动物模型的探讨[J]. 临床小儿外科杂志,2008,7(2):18-19.
- [3]王国卿,傅春玲,李建祥,等. 大鼠松果体N-乙酰基转移酶基因的内源性昼夜表达规律[J]. 实验动物与比较医学,2007,27(4):215-217.
- [4]赵维章,杜海祖. 褪黑素对动物生殖的影响[J]. 中兽医医药杂志,2007(6):72-73.
- [5]裴小英,郭定宗,郭锐. 松果体和褪黑素的生物学作用研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2007,54(7):60-63.
- [6]孙兆贵,顾正. KiSS-1/GPR54系统的生殖内分泌功能研究进展[J]. 生殖与避孕,2009,9(6):373-377.
- [7]堵吉. 持续光照对雌性大鼠生殖内分泌节律的影响及滋阴补阳序贯中药干预作用的实验研究[D]. 南京:南京中医药大学,2012.
- [8]李轶. 多囊卵巢动物模型的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2008,27(6):380-383.

(下转第1792页)

篇,名为《薛生白湿热条辨》^[10]。而上海市中医文献馆的杨杏林先生则于认真调研后云:“经查,最早认为是薛氏著述并加以刊载的是清代嘉庆九年徐行辑著的《医学蒙求》。此时距薛生白卒世的乾隆三十五年已经有 34 年。嘉庆十四年舒松摩重刻《医师秘笈》时亦将此篇收录其中”。

《湿热病篇》原本未曾获见,版本有多种,编次、条文互有出入。王孟英在《温热经纬》中云:“医师秘笈仅载前 35 条,江白仙本与温热赘言于 35 条止采 20 条,而多后之 11 条,且编次互异,无从订正。偶遇友人顾听泉学博处见抄本。湿热条辨云,曩得于吴人陈秋垞赞府者,虽别无发明,而 46 条全列,殆原稿次序固如是耶。今从之,俾学者得窥全豹焉。”可见王孟英所录之《湿热病篇》乃是友人处所得之“抄本”而“从之”,且并未见到该篇为薛生白所作之片言只语。

近年来,业内人士仁者见仁,智者见智。赵主勋^[11]通过文献调查,发表“《湿热病篇》为薛生白所著的几点质疑”,为怀疑和否定《湿热条辨》(即《湿热病篇》)系薛生白所著的观点提供了新的论据。杨杏林^[12]撰“《湿热条辨》作者辨疑”,认为《湿热条辨》的著者非薛生白本人,实为后人增补陈平伯著述的部分内容托名而成。

从内容来看,《指南集》中第 3 篇之《湿温证条例》,与《温热经纬》中之《薛生白湿热病篇》,二者相同或雷同之处颇多,其体例、语言亦多相似。杨杏林先生“托名”之说不无道理。

综上所述,从清乾隆二十七年《医约》中第 3 部

分的《温热症条例》,到乾隆二十八年沈之炜的跋,再到嘉庆十四年《指南集》的出版,直到咸丰二年王孟英的《温热经纬》,从时间、体例、署名、内容等方面形成了一条可采信的证据链,加之本文其他方面的佐证,《指南集》第 3 篇为陈平伯所著的可能性较大。

参考文献

- [1]刘玉玮.《温热病指南集》版本考述[J]. 中华医史杂志, 2006,36(3):148-149.
- [2]清·陈祖恭. 温热病指南集[M]. [出版地不详,堂号不详]. 嘉庆己巳新镌(清·嘉庆十四年,即 1809 年).
- [3]李经纬. 中医人物词典[M]. 上海:上海辞书出版社, 1988:319.
- [4]李云. 中医人名词典[M]. 北京:北京国际文化出版公司, 1988:505.
- [5]王道瑞. 中国医籍提要(下)[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1988:266.
- [6]曹洪欣. 温病大成·第二部[M]. 福州:福建科学技术出版社,2007:449.
- [7]清·陈祖恭. 温热病指南集[M]. 云间复园刻本,光绪丙子夏(清光绪二年,即 1876 年):35.
- [8]段逸山. 医古文[M]. 上海:上海科学技术出版社,1984:91.
- [9]郑伟章. 金山钱氏刻书[J]. 中国出版,1990,(4):102-110.
- [10]马建. 温病学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2008:215.
- [11]赵主勋.《湿热病篇》为薛生白所著的几点质疑[J]. 成都中医学院学报,1988,11(3):3-6.
- [12]杨杏林.《湿热条辨》作者辨疑[J]. 中医文献杂志,2011, 29(1):24-26.

(收稿日期:2013-02-28;修回日期:2013-05-02)

[编辑:黄 健]

(上接第 1769 页)

- [9]陈群,王剑,李杰芬. 抑制褪黑素分泌对青春期前大鼠 NE、E 的影响及滋阴泻火方药的作用[J]. 北京中医药大学学报,2006,29(1):31-33.
- [10]堵吉. 松果腺褪黑素及其受体对卵巢作用及中医药干预的研究进展[J]. 医学综述,2012,18(12):1788-1791.
- [11]刘晓燕,郭霞珍,许筱颖,等. 反季节光照模拟对大鼠血清褪黑素及性腺轴激素的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009,27(1):69-71.
- [12]任青玲,谈勇,孙丽洲. 中药滋阴/补阳方序贯治疗多囊卵巢综合征 31 例临床研究[J]. 江苏中医药,2008,40 (3):40-43.
- [13]刘建华,任青玲. 补肾调周法治疗黄体功能不全性不孕 32 例[J]. 河北中医,2002,24(4):264-265.
- [14]Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological im-

plications[J]. Fertil Steril,2009,92(1):328-343.

- [15]Lee HJ, Bang SH, Lee KH, et al. Positive regulation of fur gene expression via direct interaction of fur in a pathogenic bacterium, *Vibrio vulnificus*[J]. J Bacteriol, 2007,189(7):2629-2636.
- [16]李连瑞,何良军,吴静. 褪黑激素对生殖的调控机理及其在动物繁殖中的作用和应用前景[J]. 动物科学与动物医学,2002,19(3):11-14.
- [17]Tilly KI, Banerjee S, Banerjee PP, et al. Expression of the p53 and Wilms' tumor suppressor genes in the rat ovary: gonadotropin repression in vivo and immunohistochemical localization of nuclear p53 protein to apoptotic granulosa cells of atretic follicles[J]. Endocrinology, 1995,136(4):1394-1402.

(收稿日期:2013-02-20;修回日期:2013-05-20)

[编辑:邓 媛]