

• 实验研究 •

补肾法、疏肝法对超促排卵小鼠卵母细胞数量
及 GDF-9 表达的影响

杨丽芸 杜惠兰* 白 静 贺 明 孙晓换 范丽洁

(河北医科大学中西医结合学院, 河北省石家庄市新石南路 326 号, 050091)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173294)

* 通讯作者: duhuilan@163.com, 13931150880

[摘要] 目的 观察补肾法、疏肝法对超促排卵小鼠卵母细胞数量及质量的影响。方法 将 90 只雌性昆明小鼠随机分为对照组、正常组、补肾高剂量组、补肾低剂量组、疏肝高剂量组、疏肝低剂量组各 15 只, 补肾高、低剂量组分别给予补肾调经方精制口服液 5.4、2.7 g/ml, 疏肝高、低剂量组分别给予逍遥丸混悬液 0.6、0.3 g/ml, 对照组和正常组用蒸馏水灌胃, 各组小鼠按均 1 ml/100 g 体重灌胃, 连续 10 d。第 11 日除正常组外其余各组小鼠腹腔注射孕马血清促性腺激素, 48 h 后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素, 16 h 后测定各组小鼠血清中雌二醇(E_2)、促黄体生成激素(LH)和促卵泡生成激素(FSH)的水平, 比较各组排卵数、优质卵泡数, 检测卵母细胞中生长分化因子-9(GDF-9)蛋白和 GDF-9 mRNA 的表达。结果 各给药组 FSH、LH、 E_2 表达和 GDF-9 蛋白及其 mRNA 显著高于对照组($P < 0.05$); 并且补肾高剂量组和疏肝高剂量组均显著高于补肾低剂量组和疏肝低剂量组($P < 0.05$)。各给药组优质卵泡数均高于对照组($P < 0.05$)。对照组及各给药组排卵数较正常组显著增加($P < 0.05$)。结论 补肾法、疏肝法可增加小鼠卵母细胞数量、提高优质卵泡率、促进卵子排出, 其作用机制可能与调控卵母细胞 GDF-9 表达相关。

[关键词] 补肾法; 疏肝法; 补肾调经方; 逍遥丸; 卵母细胞; 生长分化因子-9

Effects of Kidney-Supplementing Therapy and Liver-Coursing Therapy on Oocytes and Growth Differentiation Factor-9 in Super-ovulated Mice

YANG Liyun, DU Huilan, BAI Jing, HE Ming, SUN Xiaohuan, FAN Lijie

(Integrative Medicine College, Hebei Medical University, Hebei Province 050091)

ABSTRACT Objective To observe the effects of kidney-supplementing therapy and liver-coursing therapy on the quantity and quality of oocytes in superovulated mice. **Methods** Ninety female Kunmin mice were randomized into control group, normal group, kidney-supplementing high-dose group, kidney-supplementing low-dose group, liver-coursing high-dose group and liver-coursing low-dose group, with 15 in each. The kidney-supplementing high-dose group and kidney-supplementing low-dose group was given 5.4 g/ml and 2.7 g/ml refined oral solution of kidney-supplementing menstruation-regulating formula respectively. The liver-coursing high-dose group and liver-coursing low-dose group was given 0.6 g/ml and 0.3 g/ml suspension of Xiaoyao Pill (Free Wanderer Pill). The control group and normal group were given distilled water intragastrically. The mice in each group were gavaged with 1 ml/100 g for 10 consecutive days. On the 11th day, mice in groups except the normal group were peritoneally injected gonadotropin from pregnant horse, and 48 hours afterwards, human chorionic gonadotropin was injected peritoneally. The serum estradiol (E_2), luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) was detected after 16 hours. The ovulation rates and quality follicle counts were compared. The expressions of growth and differentiation factor-9 (GDF9) protein and GDF9 mRNA in oocytes were detected. **Results** Comparing with the control group, the expressions of FSH, LH, E_2 , GDF9 and GDF9 mRNA were significantly increased in other groups ($P < 0.05$), especially in two high-dose administration groups as comparing with two low-dose administration groups ($P < 0.05$). The quality follicle counts in the administration groups were significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Comparing with the normal group, the ovulation rates in the control group and administration groups were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The kidney-supplementing therapy and liver-coursing therapy can increase the quantity of oocytes, improve the rate of quality follicular and promote ovum, which may be relevant to regulating the expression of GDF9 in oocytes.

Keywords kidney-supplementing therapy; liver-coursing therapy; kidney-supplementing menstruation-regulating formula; Xiaoyao Pill; oocytes; growth differentiation factor-9

卵巢功能失调可导致月经失调、功能失调性子宫出血、闭经、多囊卵巢综合征等多种妇科内分泌疾病及不孕症。我国不孕症发病率为 7%~10%，其中卵巢因素占女性不孕的 25%~35%^[1]。临床上常用补肾法、疏肝法治疗不孕症以提高排卵率及妊娠率，且疗效肯定^[2-3]。临床研究发现，补肾调经方可以增加体外受精—胚胎移植(IVF-ET)患者卵泡液中生长分化因子-9(GDF-9)的水平，上调颗粒细胞中的表达而改善卵母细胞质量，提高受精率，优质胚胎率及临床妊娠率^[4]。补肾法、疏肝法是否能改善卵母细胞中 GDF-9 的表达而改善生殖功能值得进一步研究，本研究通过观察补肾法、疏肝法对小鼠卵母细胞的影响，探讨其在促卵母细胞发育中的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

健康雌性昆明小鼠 90 只，6~7 周龄，体重 28~32 g，购自河北实验动物中心，动物合格证号：1207020。

1.2 药物

补肾调经方(由熟地黄 20 g、当归 9 g、山药 12 g、山萸肉 15 g、女贞子 9 g、枸杞子 12 g、紫河车 10 g、淫羊藿 10 g、菟丝子 12 g、覆盆子 10 g、香附 6 g 等组成)所需药材一次性购自石家庄乐仁堂药房，经过河北医科大学中药系鉴定为正品，由本校中药系制成精制口服液。高剂量含生药 5.4 g/ml，低剂量含生药 2.7 g/ml。逍遥丸，河南宛西制药股份有限公司生产，批号：120404；将 200、100 丸分别溶于 125 ml 蒸馏水中制成混悬液，高剂量含生药 0.6 g/ml，低剂量含生药 0.3 g/ml，置 4℃ 冰箱中备用。孕马血清促性腺激素(PMSG)，上海市计划生育科学研究所产品，批号：20120410；人绒毛膜促性腺激素(HCG)，丽珠集团丽珠制药厂生产，批号：120413。

1.3 主要试剂及仪器

人促黄体生成激素(LH)放射免疫分析药盒，批号：S10950178；雌二醇(E₂)放射免疫分析药盒，批号：S10950184；人促卵泡生成激素(FSH)放射免疫分析药盒，批号：S10950177，以上试剂盒均购自天津九鼎医学生物工程有限公司。兔抗小鼠 GDF-9 抗体购自武汉博士德生物试剂有限公司，批号：BA1288；RNA 提取试剂盒购自美国 ABI 公司，批号：AM1560；M-MLV 反转录试剂盒购自美国 Promega 公司，批号：M1701；SYBR Green I 荧光定量

PCR 试剂盒购自加拿大 Fementas 公司，批号：K0221。TXD3 型细胞涂片离心机，长沙湘仪离心机仪器厂；ND2000 型紫外分光光度计，美国 Thermo 公司；ABI7300 型荧光定量 PCR System，美国 ABI 公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药情况

将 90 只雌性小鼠按照随机数字表法分为 6 组，即补肾高剂量组、补肾低剂量组、疏肝高剂量组、疏肝低剂量组、对照组和正常组，每组 15 只。自由饮水和进食，饲养室温度保持在(20±1)℃，相对湿度约 50%，自动控制光照 12 h，黑暗 12 h。每日 8:00 灌胃给药，补肾高、低剂量组分别给予补肾调经方精制口服液 5.4 g/ml、2.7 g/ml，疏肝高、低剂量组分别给予逍遥丸混悬液 0.6 g/ml、0.3 g/ml，对照组和正常组用蒸馏水灌胃。各组小鼠均 1 ml/100 g 体重灌胃，连续 10 天。

2.2 模型制备

参考文献[5]，除正常组外其他各组小鼠第 11 日腹腔注射 PMSG 10 IU/只，48 h 后腹腔注射 HCG 10 IU/只。正常组每日阴道涂片，观察动情周期。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 激素水平测定 正常组小鼠阴道涂片见到大量角化上皮细胞的次日、其余各组小鼠注射 HCG 16 h 后取材，用摘除眼球法各取血 3 ml，(24±2)℃ 室温静置 2 h 后 3000 r/min 离心 3 min，取血清置于 -20℃ 冰箱中保存待测。采用放射免疫分析法测定血清中 E₂、LH 和 FSH 的水平。

2.3.2 卵母细胞提取方法及计数 各组小鼠取血后脱颈椎处死，在超净工作台中手术打开实验小鼠腹腔，分别取出双侧输卵管，置于装有 PBS 的培养皿中，在体视镜下用 1 ml 注射器针头针划破输卵管壶腹部，观察到有絮状物释出，此即为卵丘卵母细胞复合体(COCs)，进行排卵数目检查。同时对卵细胞形态进行评价，卵泡浆饱满、颗粒细胞致密为优质卵泡，异常包括卵泡浆不饱满、颗粒细胞分布不均匀等^[6]，然后用透明质酸酶消化掉颗粒细胞，用 PBS 反复冲洗，获得 MⅡ期卵母细胞，计数优质卵泡数量。

2.3.3 免疫组化染色 将 MⅡ期卵母细胞移到多聚赖氨酸玻片表面(每片 10 个细胞)，风干后，用 4%多聚甲醛固定 120 min，30%过氧化氢混合纯甲醇浸泡 30 min，5%牛血清白蛋白 20 min。加入 1:50 稀释的 GDF-9 抗体 2 h，按照 SABC 免疫组化方

表 1 各组小鼠血清 FSH、LH、E₂ 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FSH(mIU/ml)	LH(mIU/ml)	E ₂ (pg/ml)
正常组	15	3.754±0.643	5.216±0.817	10.368±2.250
对照组	15	4.309±0.609*	7.532±1.127*	12.700±1.707*
补肾高剂量组	15	5.467±0.730*△	13.974±2.323*△	18.142±2.536*△
补肾低剂量组	15	4.897±0.367*△▲	9.672±1.551*△▲	15.353±2.100*△▲
疏肝高剂量组	15	5.543±0.587*△#	12.969±2.023*△#	18.066±2.242*△#
疏肝低剂量组	15	4.848±0.561*△▲▽	10.012±1.165*△▲▽	15.594±2.905*△▲▽

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与对照组比较,△ $P<0.05$;与补肾高剂量组比较,▲ $P<0.05$;与补肾低剂量组比较,# $P<0.05$;与疏肝高剂量组比较,▽ $P<0.05$

法分别加入兔抗山羊二抗、SABC 各 20 min。按照 DAB 显色法显色 10 min,脱水后封片。结合阳性细胞百分比及阳性细胞染色强弱两个方面采用 IHS 评分,评分方法为^[7]:①阳性细胞数百分比(记为 a):<1%计 0 分、1%~10%计 1 分、11%~50%计 2 分、51%~80%计 3 分、81%~100%计 4 分。②阳性细胞显色强度(记为 b):0 分(阴性)、1 分(弱阳性)、2 分(阳性)、3 分(强阳性)。③a 与 b 乘积为 IHS 评分。

2.3.4 RT-PCR 检测 GDF-9 mRNA 表达 将分离的卵母细胞使用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 的纯度。反转录于 PCR 仪上 42℃ 进行 50 min,95℃ 加热 5 min,灭活反转录酶,然后进行 40 个循环反应:94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,于每个循环的第三个步骤收集荧光信号,扩增完毕进入结果分析界面,根据 CT 数据方法,得到目的基因表达的相对定量值(RQ 值)用于统计分析 GDF-9 mRNA 的表达量。

2.4 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件包进行统计处理。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,若满足正态性及方差齐性,多组之间比较用方差分析,否则用秩和检验;计数资料采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 各组小鼠血清中 FSH、LH、E₂ 水平比较

表 1 示,各治疗组及对照组血清 FSH、LH、E₂ 水平明显较正常组增高($P<0.05$)。与对照组比较,各治疗组血清 FSH、LH、E₂ 水平明显增高($P<0.05$);其中,补肾高剂量组及疏肝高剂量组均高于补肾低剂量组及疏肝低剂量组($P<0.05$)。

3.2 各组小鼠排卵数及优质卵泡数比较

表 2 示,对照组、补肾高剂量组和疏肝高剂量组优质卵泡数所占比例高于正常组($P<0.05$),各治疗组优质卵泡数所占比例高于对照组($P<0.05$),

其中补肾高剂量组及疏肝高剂量组均高于补肾低剂量组及疏肝低剂量组($P<0.05$)。对照组及各治疗组排卵数较正常组显著增加($P<0.05$),各治疗组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),各治疗组之间排卵数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 各组小鼠获卵数及优质卵泡数比较

组别	鼠数	卵细胞数量(个)	优质卵泡数[个(%)]	排卵数(个, $\bar{x} \pm s$)
正常组	15	166	110(66.3)	11.07±4.464
对照组	15	572	320(55.9)*	38.13±6.675*
补肾高剂量组	15	640	474(74.1)*△	42.67±8.624*
补肾低剂量组	15	571	385(67.4)*△▲	38.07±10.813*
疏肝高剂量组	15	643	482(75.0)*△#	42.87±9.172*
疏肝低剂量组	15	583	386(66.2)*△▲▽	38.87±8.476*

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与对照组比较,△ $P<0.05$;与补肾高剂量组比较,▲ $P<0.05$;与补肾低剂量组比较,# $P<0.05$;与疏肝高剂量组比较,▽ $P<0.05$

3.3 各组小鼠 GDF-9 蛋白表达阳性细胞数、染色强度及 IHS 评分比较

表 3 示,对照组卵母细胞染色强度为 1 分,表现为胞质呈黄色;正常组、补肾低剂量组与疏肝低剂量组卵母细胞染色强度为 2 分,表现为胞质呈黄色,边缘较深,呈棕黄色;补肾高剂量组和疏肝高剂量组卵母细胞染色强度为 3 分,表现为胞质呈棕黄色。对照组 IHS 评分较正常组明显降低($P<0.05$);补肾高剂量组及疏肝高剂量组 GDF-9 蛋白表达的 IHS 评分均显著高于正常组($P<0.05$)。各给药组 GDF-9 蛋白表达的 IHS 评分均显著高于对照组($P<0.05$);补肾高剂量组及疏肝高剂量组 GDF-9 蛋白表达的 IHS 评分高于补肾低剂量组和疏肝低剂量组($P<0.05$)。

3.4 各组小鼠卵母细胞 GDF-9 mRNA 表达比较

表 4 示,与正常组比较,对照组 GDF-9 mRNA 表达降低、各治疗组 GDF-9 mRNA 表达升高($P<0.05$);各治疗组 GDF-9 mRNA 表达较对照组明显升高($P<0.05$);补肾高剂量组、疏肝高剂量组

GDF-9 mRNA 表达较补肾低剂量组、疏肝低剂量组明显增强 ($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠 GDF-9 蛋白表达阳性细胞数、平均染色强度及 IHS 评分比较

组别	细胞数	阳性细胞数 (%)	染色强度 (分)	IHS 评分 (分)
正常组	10	55	2	6
对照组	10	20	1	2*
补肾高剂量组	10	80	3	9*△
补肾低剂量组	10	60	2	6△▲
疏肝高剂量组	10	70	3	9*△#
疏肝低剂量组	10	60	2	6△▲▽

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,△ $P < 0.05$;与补肾高剂量组比较,▲ $P < 0.05$;与补肾低剂量组比较,# $P < 0.05$;与疏肝高剂量组比较,▽ $P < 0.05$

表 4 各组小鼠卵母细胞 GDF-9 mRNA 表达比较(RQ 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GDF-9 mRNA
正常组	15	1.232±0.089
对照组	15	0.978±0.076*
补肾高剂量组	15	3.242±0.201*△
补肾低剂量组	15	2.933±0.089*△▲
疏肝高剂量组	15	3.241±0.128*△#
疏肝低剂量组	15	2.664±0.188*△▲▽

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,△ $P < 0.05$;与补肾高剂量组比较,▲ $P < 0.05$;与补肾低剂量组比较,# $P < 0.05$;与疏肝高剂量组比较,▽ $P < 0.05$

4 讨论

在生殖过程中,优质卵母细胞的数量及质量是影响妊娠结局的重要因素,正确评估卵母细胞质量,挑选优质卵子,能显著提高临床妊娠率。近年研究表明,卵母细胞在卵泡发育和自身发育成熟过程中并非处于被动状态,其通过分泌卵母细胞分泌因子(OSFs)调节周围体细胞的功能^[8-9]。GDF-9 是最早被发现的卵母细胞来源的生长因子,是目前认为的最主要的 OSFs 之一,主要表达于人和哺乳动物卵母细胞^[10-13]。本课题组前期研究提示,补肾法、疏肝法均有调节卵巢功能的作用^[14-17]。补肾调经方由养精种玉汤合五子衍宗丸加减化裁而成,方中熟地黄、枸杞子滋阴补肾,覆盆子温肾填精,于滋补肾阴药中配以补阳药,旨在阳中求阴,使“阴得阳升而泉源不竭”,当归、白芍补血养血、调补冲任,又佐香附、丹参理气活血,交通阴阳。诸药合用,滋补肾阴,调经养血,促进卵泡发育并诱发排卵,体现了中医学“肾主生殖”、“胎孕之道,精旺方能有子,经调始能成孕”的理论思想。逍遥丸为疏肝法的代表方剂,此方源于宋代《太平惠民和剂局方》。方中柴胡疏肝调

经,当归、白芍养血调经,白术、茯苓、甘草健脾益气,化气血以养肝阴,从而使肝气条达,诸药合用使肝气舒畅、肝血充盈、冲任二脉通畅,可达调经种子、诱发排卵、促进卵泡发育的效果。

本研究结果显示,各治疗组排卵数与对照组比较差异无统计学意义,提示加用补肾调经方和逍遥丸并不会减少超促排卵小鼠的排卵数目;而对照组较正常组优质卵泡数所占比例明显下降,各治疗组与对照组比较则优质卵泡数明显上升($P < 0.05$),提示应用促性腺激素会降低小鼠优质卵母细胞数量,而加用补肾调经方和逍遥丸则能显著提高优质卵泡数量。各治疗组及对照组血清 FSH、LH、E₂ 水平均高于正常组,而各治疗组的血清 FSH、LH、E₂ 水平则明显高于对照组($P < 0.05$),提示补肾调经方和逍遥丸在超排激素的影响下,能提高 FSH、LH、E₂ 表达,促进卵子排出。本研究免疫组化与 RT-PCR 结果显示,应用超促排卵药物会降低小鼠卵母细胞 GDF-9 蛋白及基因的表达,而加用补肾调经方及逍遥丸可以显著增强小鼠卵母细胞 GDF-9 蛋白及基因的表达水平,并且补肾高剂量组和疏肝高剂量组优于补肾低剂量组和疏肝低剂量组($P < 0.05$),推测补肾法和疏肝法可能是通过调节 GDF-9 的表达,并与 FSH、LH 发挥协同作用,刺激抑制素的产生,在 FSH 释放的反馈调节中起重要作用,从而调节卵泡成熟和排卵,改善卵细胞质量,而高剂量补肾调经方和逍遥丸的应用效果更佳。

参考文献

- [1]乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:351.
- [2]张晓金,袁爱英,赵敏,等. 从肝肾论治无排卵不孕症 44 例临床观察[J]. 中医杂志,2008,49(8):704-706.
- [3]杨潭芬. 益肾疏肝法治疗排卵障碍性不孕症 40 例[J]. 中医杂志,2009,50(10):924.
- [4]常秀峰,杜惠兰,高星,等. 补肾调经方对输卵管性不孕症患者体外受精-胚胎移植超排卵周期 GDF-9 的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(6):780-783.
- [5]李秦,朱德生,刘玉林,等. 不同激素对哺乳动物超数排卵作用的研究[J]. 实验动物科学与管理,1997,14(3):1-6.
- [6]连方,孙振高,张建伟,等. 二至天葵方对小鼠卵细胞质量影响的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2004,24(7):625-627.
- [7]Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors[J]. Cancer, 2000,89(12):2637-2645.

(下转第 604 页)

黄共为君药,黄芪补气,与党参相伍,益气生津。生地黄的与党参、黄芪合用,健脾补中而不温燥,益肾养阴而不滋腻,山萸肉、山药、茯苓共为臣药。山萸肉酸温,功专补益肝肾,敛精益阴,与生地黄的共用,补肾中之水。山药为补脾肾之常品,茯苓淡而平,健脾助运而力缓,与山药相须为用,茯苓得山药则利湿而不伤阴,山药得茯苓则补脾不留湿,共助君药健脾补肾,益气养阴。

本研究结果显示,参芪地黄汤高、低剂量组及雷公藤组均可降低 IgA 肾病大鼠尿蛋白定量,但中药低剂量组尿蛋白定量仍高于雷公藤组($P<0.05$),而中药高剂量组差异无统计学意义($P>0.05$),说明中药低剂量的药效稍差。与模型组比较,中药高、低剂量组和雷公藤组大鼠肾组织 nephrin、podocin 蛋白及其 mRNA 均明显升高($P<0.05$),而 3 个给药组之间差异无统计学意义($P>0.05$),说明参芪地黄汤在提高 IgA 肾病大鼠肾组织 nephrin、podocin 方面与雷公藤组疗效相等。

综上所述,参芪地黄汤能有效降低 IgA 肾病模型大鼠尿蛋白定量,其机制可能通过抑制足细胞相关分 nephrin 和 podocin 表达的减少,稳定肾小球裂孔隔膜分子屏障及电荷屏障,维持足细胞形态及功能完整,减少尿蛋白的漏出。

参考文献

- [1]Lai KN. Pathogenesis of IgA nephropathy[J]. Nat Rev Nephrol, 2012, 8(5):275-283.
- [2]陈香美,陈以平,李平,等. 1016 例 IgA 肾病患者中医证候的多中心流行病学调查及相关因素分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(3):197-201.
- [3]马红珍,陈红波,何灵芝,等. 加减参芪地黄汤治疗 IgA 肾病“气阴两虚证”临床疗效观察因素分析[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(5):491-493, 496.
- [4]Woodroffe AJ, Gormly AA, Clarkson AR, et al. Experimental cirrhosis and deposition of glomerular IgA immune complexes[J]. Contrid Nephrol, 1984, 40: 51-54.
- [5]汤颖,姜探奇,成彩联,等. 实验性 IgA 肾病模型的改进[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2006, 27(2):183-187.
- [6]Lemley KV, Lafayette RA, Ssfai M, et al. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy[J]. Kidney Int, 2002, 61(4):1475-1478.
- [7]Patrakka J, Tryggvason K. Nephrin-a unique structural and signaling protein of the kidney filter[J]. Trends Mol Med, 2007, 13(9):396-403.
- [8]Sun D, Zhao X, Meng L. Relationship between urinary podocytes and kidney diseases[J]. Ren Fail, 2012, 34(3):403-407.
- [9]Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, et al. Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries[J]. Biol Reprod, 1999, 60(2): 381-386.
- [10]罗亚萍,马惠荣,杜惠兰,等. 逍遥丸对雄激素致无排卵大鼠卵巢功能的影响[J]. 河北中医药学报, 2009, 24(3): 33-34.
- [11]杜惠兰,段彦苍,宋翠森. 补肾调经方对雄激素诱导无排卵大鼠血清生殖激素及子宫、卵巢性激素受体水平的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(4): 24-26.
- [12]宋翠森,杜惠兰,马惠荣,等. 补肾调经方对雄激素致无排卵大鼠卵巢转化生长因子 β_1 及其受体表达的影响[J]. 中国医科大学学报, 2006, 35(6): 600-605.
- [13]杜惠兰,宋翠森,马惠荣,等. 补肾调经方对雄激素致不孕大鼠子宫一氧化氮、血清睾酮的影响[J]. 中成药, 2007, 29(2): 284-285.
- [14]Erickson GF, Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis[J]. Trends Endocrinol Metab, 2000, 11(5): 193-198.
- [15]Moore RK, Shimasaki S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15[J]. Mol Cell Endocrinol, 2005, 234(1-2): 67-73.
- [16]McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9[J]. Mol Endocrinol, 1995, 9(1):131-136.
- [17]Hayashi M, McGee EA, Min G, et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles[J]. Endocrinology, 1999, 140(3):1236-1244.
- [18]Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(8):2744-2750.

(上接第 600 页)