

本文引文格式:林光耀,张米佳,叶涛,等.一次性腹腔注射环磷酰胺致卵巢储备功能下降模型大鼠意外死亡的病理分析[J].右江民族医学院学报,2021,43(6):730-735.

【论著与临床报道】

一次性腹腔注射环磷酰胺致卵巢储备功能下降模型大鼠意外死亡的病理分析

林光耀¹,张米佳¹,叶涛¹,邓莉¹,王茂霞²,王永周¹

(1. 西南医科大学附属中医医院妇科,四川 泸州 646000;
2. 西南医科大学附属中医医院病理科,四川 泸州 646000)

摘要:目的 基于病理学观察探析一次性腹腔注射环磷酰胺致卵巢储备功能下降(diminished ovarian reserve,DOR)模型大鼠意外死亡的影响。方法 将动情周期正常的雌性未孕SD大鼠60只,按随机数字表法分为空白对照组10只和造模组50只,造模组大鼠使用一次性腹腔注射环磷酰胺90 mg/kg,空白对照组大鼠注射相同剂量0.9%生理盐水。分别于注射环磷酰胺前和注射后第1周、第2周测量两组大鼠体重;对意外死亡大鼠立即解剖,肉眼观察其内脏大体形态学变化,并摘取双肺、心脏、肝脏、胃及双侧肾脏进行HE染色,于光镜下观察意外死亡大鼠重要器官病理形态学改变。结果 实验期间空白对照组大鼠体重逐渐增长,未出现死亡大鼠;造模组大鼠体重逐渐下降,与空白对照组大鼠相比差异有统计学意义($P < 0.001$),并于腹腔注射环磷酰胺后至灌胃前共计12只大鼠死亡,死亡率为24.00%(12/50)。对意外死亡大鼠重要脏器进行HE染色病理学观察发现与对照组相比,造模组大鼠肺组织呈广泛淤血,肺泡间隔增宽,肺上皮细胞水肿改变;胃浅表黏膜糜烂,浅表上皮细胞脱落。结论 一次性腹腔注射环磷酰胺诱导DOR模型可使大鼠出现肺和胃的损伤,可能对造模组大鼠的意外死亡有重要影响。

关键词:腹腔注射;环磷酰胺;卵巢储备功能下降;大鼠

中图分类号:R711.7 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2021)06-0730-06
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.06.006

Pathological analysis of one-time intraperitoneal injection of cyclophosphamide on accidental death of rats modeled with diminished ovarian reserve

Lin Guangyao¹, Zhang Mijia¹, Ye Tao¹, Deng Li¹, Wang Maoxia², Wang Yongzhou¹

(1. Department of Gynecology, The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China; 2. Department of Pathology, The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of one-time intraperitoneal injection of cyclophosphamide on accidental death of rats modeled with diminished ovarian reserve (DOR) based on pathological observations. **Methods** Sixty non-pregnant female SD rats during the normal estrous cycle were divided into a blank control group ($n = 10$) and a model group ($n = 50$) according to random number table. Rats in the model group were given one-time intraperitoneal injection of cyclophosphamide at 90 mg/kg, while rats in the blank group were

基金项目:四川省中医药管理局项目(2021MS105);西南医科大学-西南医科大学附属中医医院联合项目(2020XYLH-042)

第一作者简介:林光耀(1994-),男,在读硕士研究生,研究方向:妇科内分泌学,E-mail:lerele-st@hotmail.com

通讯作者简介:王永周(1970-),女,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合治疗妇科内分泌疾病,E-mail:fkwyz123747@163.com

injected with 0.9% normal saline at the same dose. The body weight of rats in two groups was measured before injection and at the first week as well as the second week after injection of cyclophosphamide, respectively. The rats that died accidentally were dissected immediately and the gross morphological changes of their viscera were observed by naked eye. The lungs, heart, liver, stomach and kidneys of died rats were collected for HE staining, and the pathological changes of their important organs were observed under the light microscope. **Results** During experiment, the weight of rats in the blank control group increased gradually, and no rats died. The weight of rats in the model group decreased gradually, and the difference in weight between two groups was statistically significant ($P < 0.001$). A total of 12 rats in the model group died after intraperitoneal injection of cyclophosphamide and before intragastric administration, with a mortality rate of 24.00% (12/50). Important organs of the rats that died by accident were pathologically observed after HE staining. The observation results showed that, compared with those of the blank group, the rats in the model group had extensive congestion in the lung tissue, widened alveolar septum, edema of pulmonary epithelial cells, erosion of superficial gastric mucosa as well as shedding of gastric superficial epithelial cells. **Conclusion** Modeling DOR induced by one-time intraperitoneal injection of cyclophosphamide can cause lung and stomach injury in rats, which may have an important influence on the accidental death of rats in the model group.

Key words: intraperitoneal injection; cyclophosphamide; diminished ovarian reserve; rats

卵巢储备功能下降(diminished ovarian reserve, DOR)是女性生育能力降低和月经稀发的重要原因,并以卵泡刺激素水平(follicle stimulating hormone, FSH)升高和抗苗勒管激素水平(anti-Müllerian hormone, AMH)下降为特征,也是早发性卵巢功能不全和卵巢早衰的初始阶段^[1-3]。因此,越来越多的研究更积极于探索此病的发病机制以及治疗药物的作用靶点,故使用 DOR 模型大鼠成为目前实验研究的主要方法,其中使用一次性腹腔注射环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)诱导 DOR 模型大鼠法成为应用较为广泛的方式^[4-6]。然而,使用 CTX 所引起的不良反应包括骨髓抑制(全血细胞减少)、胃肠道反应(腹泻和便秘等)和泌尿系统反应(尿血和出血性膀胱炎等)、生殖系统反应(卵巢早衰和精子减少症等),且与药物剂量和用药时间呈相关性。但对于一次性腹腔注射 CTX 诱导 DOR 模型大鼠的剂量尚无统一标准,国内外研究所常用的剂量有 90 mg/kg^[4]和 75 mg/kg^[7],尽管诸多研究对造模所使用的 CTX 不同剂量进行了比较^[8-9],但鲜有文献对造模过程中药物对意外死亡大鼠的影响进行分析。故笔者通过对实验过程中大鼠以 90 mg/kg 剂量一次性腹腔注射 CTX 后至药物灌胃前期间意外死亡大鼠进行大体解剖并对心、肺、肾、肝和胃行 HE 染色观察,以探究药物可能对大鼠意外死亡的影响,从而提高 DOR 模型大鼠存活率,为将来研究减少甚至避免大鼠意外死亡提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级 10~12 周龄 SD 雌性未孕大鼠 60 只,购于西南医科大学动物实验中心(城北校区),动物许可证号:SCXK(川)2018-17,体重(247±

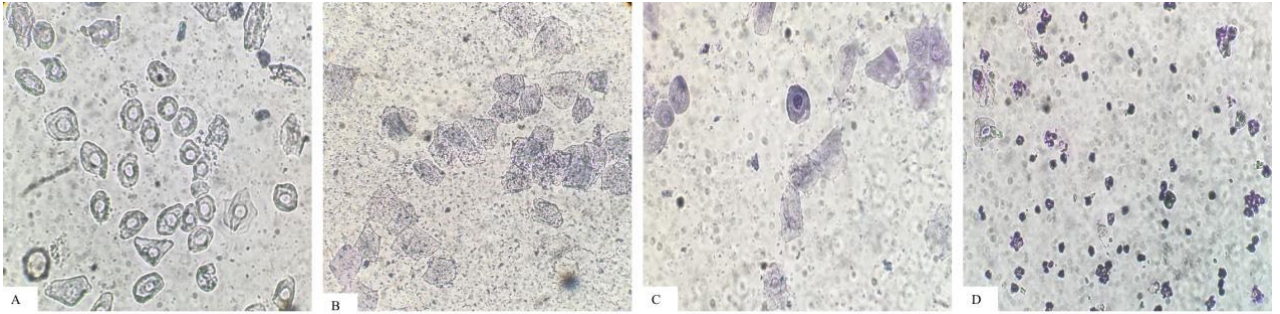
14) g,饲养室温度 23~25 °C,每笼饲养箱饲养 5 只大鼠,所有大鼠均自由饮水及摄食大鼠维持饲料,12 h 昼夜交替,每 2~3 天更换垫料 1 次。适应性喂养 1 周,观察大鼠一般情况,包括:体质量、小便颜色、大便质地、精神状态、皮毛疏密程度等;随后两周行阴道脱落细胞学检查,筛选动情周期正常的大鼠纳入本实验。

1.2 实验主要试剂 注射用 CTX(江苏盛迪医药有限公司)规格:0.2 克/支,保存于 4 °C 冰箱,购自西南医科大学附属中医医院;黏附载玻片(江苏世泰实验器材有限公司);定性滤纸、瑞氏-姬姆萨复合染液(北京索莱宝科技有限公司);苏木素-伊红染色试剂盒(杭州吴鑫生物科技股份有限公司);4%多聚甲醛溶液(Bio-sharp 生物科技);二甲苯(中国山东莱阳铁塔化工制品厂)。

1.3 实验分组及造模 选取清洁级 10~12 周龄 SD 雌性未孕大鼠 60 只,适应性喂养一周后,连续两周定时行阴道脱落细胞学检查。使用 20 μ l 移液器吸取 0.9%氯化钠溶液,缓慢插入大鼠阴道内约 0.2~0.4 cm,反复抽吸 2~3 遍,将移液器枪头中含有脱落细胞的液体均匀转移至载玻片上,按照瑞氏-姬姆萨复合染液说明书操作进行细胞染色观察,大鼠正常动情周期包括动情前期:大量有核上皮细胞;动情期:大量无核角化细胞;动情后期:大量无核角化细胞混杂少量有核上皮细胞;动情间期:白细胞占优势,偶见少量有核上皮细胞(见图 1)。将有正常动情周期大鼠随机分为空白组对照组 10 只和造模组 50 只。参照一次性腹腔注射 CTX 90 mg/kg 诱导 DOR 模型法^[4,10],造模前所有大鼠均禁食禁饮 12 h,用 10 ml 0.9%氯化钠溶液配制 0.2 g CTX,将配制好的溶液置于 4 °C 冰箱保存并于 2

h 内注射完毕,腹腔注射部位均选择大鼠左侧下腹部,同时将大鼠处于头低位,针头与腹壁呈 $40^{\circ}\sim 50^{\circ}$ 角之间,避免刺伤膀胱及腹腔脏器,针头刺入腹腔约 0.5 cm 后回抽,确保针头进入腹腔,缓慢推注药物,用拇指

顺时针轻柔大鼠腹部 10 s 促使药物分布。空白组大鼠注射同剂量生理盐水。以上操作均由同一实验人员和助手进行。



A: 动情前期; B: 动情期; C: 动情后期; D: 动情间期。

图 1 大鼠正常动情周期阴道脱落细胞观察(瑞氏-姬姆萨染色, $\times 100$)

1.4 病理学观察 造模组大鼠腹腔注射 CTX 后均按前期方式正常饲养,每天定时观察各组大鼠一般情况并详细记录,当发现意外死亡大鼠后立即于无菌操作台上解剖,先观察大鼠内脏的一般大体形态,随后摘取双肺、心脏、肝脏、胃和双侧肾脏组织,去除多余脂肪组织后用 PBS 溶液(pH 值 7.2)洗去多余血渍,放入盛有 4% 多聚甲醛溶液的 EP 管中固定,并于 4°C 冰箱保存,组织与多聚甲醛溶液比例为 1:10,石蜡包埋所取组织、切片、HE 染色、光镜下观察各组织病理学变化。

1.5 统计学方法 数据使用统计学 SPSS 23.0 软件处理,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用方差分析(One-Way ANOVA),组间比较用 LSD 检验,成组设计两样本均数比较用 t 检验,方差不齐时采用 t' 检验,独立样本资料采用 χ^2 检验,计数资料采用率(%)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况观察 与对照组相比,造模组大鼠精神萎靡,活动量减少,进食减少,体质量逐渐下降。造模后第 2 周体重与对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。见表 1。

2.2 病理学结果

2.2.1 大鼠胃组织病理学结果 肉眼观察造模组大鼠胃组织均出现胃体积气,未见胃内容物;肉眼观察对照组大鼠胃组织形态正常,可见胃内容物;两组标本均未见胃穿孔及溃疡表现。通过对两组大鼠胃组织进行病理形态学观察发现,与对照组相比,造模组大鼠胃浅表黏膜糜烂,浅表上皮细胞脱落(见图 2)。

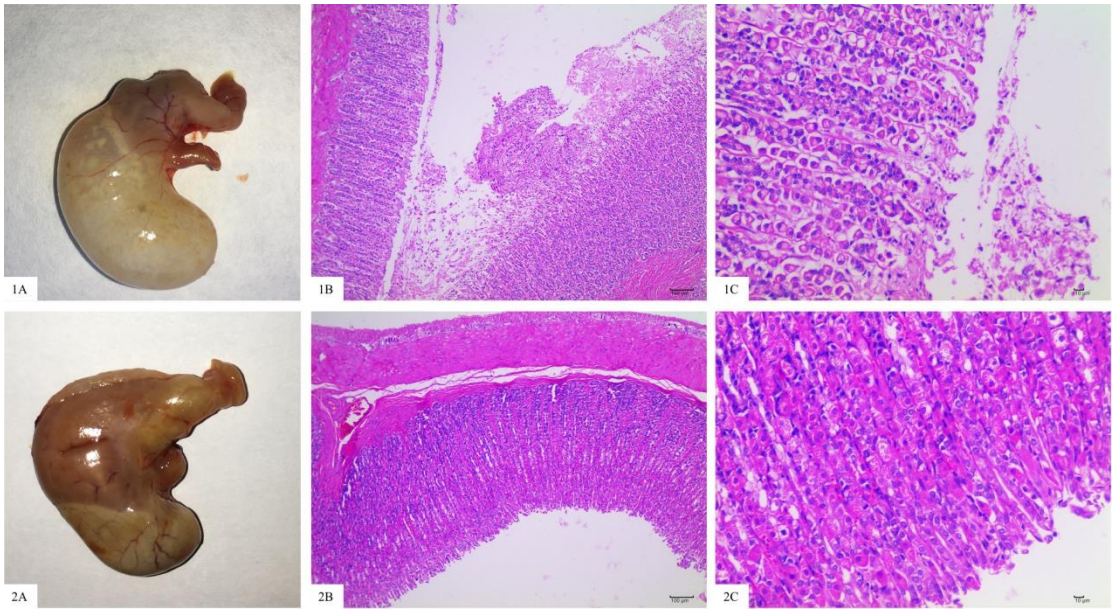
表 1 各组大鼠一般情况比较

一般情况	对照组 ($n=10$)	造模组 ($n=50$)	t'/χ^2	P
体重/g				
造模前	261.80 ± 8.38	263.72 ± 16.26	-0.547	0.584
造模后 1 周	267.00 ± 7.06	261.64 ± 17.03	1.632	0.102
造模后 2 周	272.70 ± 8.65	253.64 ± 17.33	5.190	0.000
死亡数				
造模后 1 周	0(0/10)	8.00(4/50)	0.857	0.354
造模后 2 周	0(0/10)	17.39(8/46)	2.029	0.154
不良反应数				
大便干燥	0(0/10)	4.00(2/50)	0.413	0.520
大便稀溏	0(0/10)	30.00(15/50)	4.000	0.045
尿血	0(0/10)	4.00(2/50)	0.414	0.520
鼻出血	0(0/10)	22.00(11/50)	2.693	0.101
眼眶出血	0(0/10)	18.00(9/50)	2.118	0.146
脱毛	0(0/10)	4.00(2/50)	0.414	0.520
喘息样呼吸	0(0/10)	4.00(2/50)	0.414	0.520
合并多种以上情况	0(0/10)	20.00(10/50)	2.400	0.121

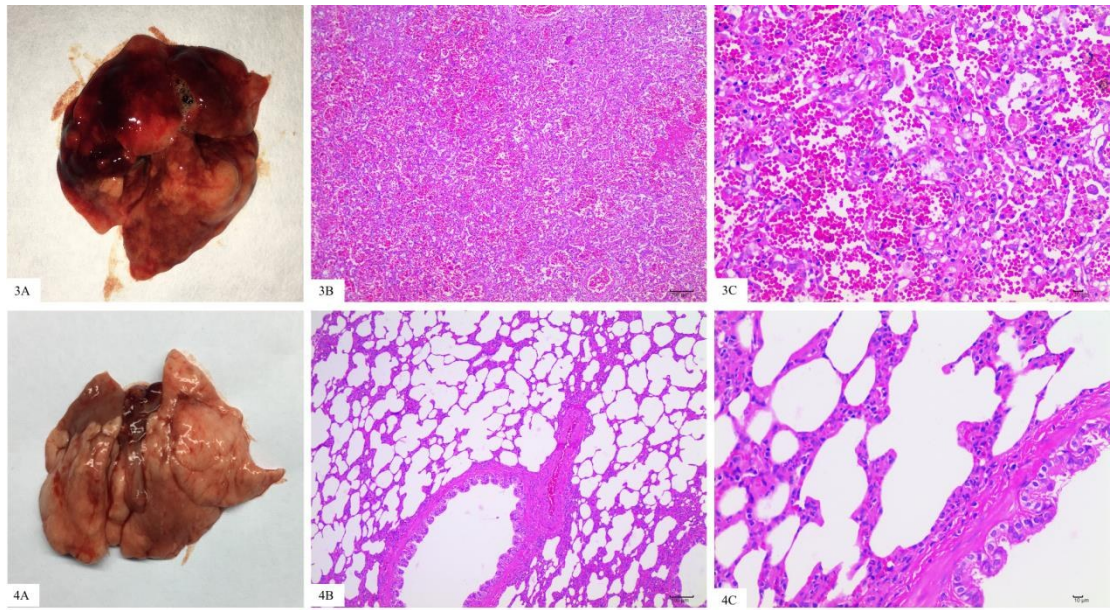
注:表内计量资料数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,计数资料数据用 $[n(\%)]$ 表示。

2.2.2 大鼠肺组织病理学结果 肉眼观察造模组大鼠肺组织呈深红色或暗红色,多数大鼠肺组织有明显的肺水肿改变,并且有 2 例大鼠出现胸腔积液表现;肉眼观察对照组大鼠肺组织呈粉红色,均未见胸腔积液表现。通过对两组大鼠肺组织进行病理形态学观察发现,与对照组相比,造模组大鼠肺组织呈广泛淤血,肺泡间隔增宽,肺上皮细胞水肿改变(见图 3)。

2.2.3 大鼠心脏、肝脏和双侧肾脏组织病理学结果 分别通过肉眼及病理形态学对比观察两组大鼠心脏、肝脏和双侧肾脏组织均未见明显异常。



1A 和 2A 分别为造模组和对照组肉眼观；1B 和 2B 分别为造模组和对照组 (HE×100)；1C 和 2C 分别为造模组和对照组 (HE×400)。
图 2 造模组与对照组大鼠胃组织



3A 和 4A 分别为造模组和对照组肉眼观；3B 和 4B 分别为造模组和对照组 (HE×100)；3C 和 4C 分别为造模组和对照组 (HE×400)。
图 3 造模组与对照组大鼠肺脏

3 讨论

对 DOR 模型大鼠的建立方法主要包括腹腔注射 CTX^[4]、灌胃雷公藤多甙^[11]、腹腔注射去氧乙烯基环己烯和顺铂^[12-13]、重复制动应激^[14]、慢性应激^[15]、γ 射线照射^[16]等。其中使用一次性腹腔注射 CTX 能对正常卵巢结构和功能产生影响,加速卵巢颗粒细胞凋亡,诱导卵泡的质量和数量发生改变,其特点与人类 DOR 表现相似,且兼有操作简单、成本低和可重复性稳定等

优点,故目前研究常利用此法诱导 DOR 模型大鼠^[17-18]。虽然 CTX 对卵巢的毒性作用机制尚未被完全阐释,但目前已被证实的主要途径包括:①CTX 被 CYP2B 和 CYP3A 激活生成 4-羟基环磷酰胺(4-OH-CPA),随后转化为醛磷酰胺,醛磷酰胺又被代谢为磷酰胺氮芥,通过 DNA 损伤诱导凋亡途径,快速破坏增殖细胞^[19];②CTX 通过激活 PI3K/PDEN/AKT 信号通路使卵母细胞中 FOXO3a 磷酸化增加,进一步与卵

巢 Puma 启动子中的位点结合,并以不依赖 p53 的方式激活其表达,也可诱导 DNAPK- γ H2AX-CHK2-p53/TAp63 α 信号轴激活,最终促使卵母细胞凋亡^[20-21];③CTX 药理作用具有非细胞周期特异性,一方面能破坏静止期细胞,使其迅速裂解,另一方面也可加速卵巢内原始卵泡耗竭,表现出卵巢分泌的卵泡刺激素和黄体生成素水平升高,雌二醇水平降低^[22-23]。

CTX 对卵巢的毒性影响并不是“有或无”效应,而是与药物剂量呈相关性。Maman E 等^[24]通过对 38 只成年雌性小鼠分别一次性腹腔注射 CTX 100 mg/kg (8 只)、50 mg/kg (12 只)和 0 mg/kg (18 只),观察小鼠卵巢内原始卵泡数量(primordial follicles, PMF)发现未注射 CTX 组大鼠 PMF 为(469 \pm 24)个,注射 100 mg/kg 和 50 mg/kg 组大鼠 PMF 分别为(234 \pm 19)个和(307 \pm 27)个,明显少于未注射 CTX 组,且药物剂量越大 PMF 越少($P < 0.0001$)。Wang ZY 等^[25]研究使用 CTX 50 mg/kg 剂量,每隔 1 d,连续 8 d 腹腔注射后发现大鼠肠黏膜派氏结(PPs)计数、CD19⁺细胞比例、脾脏和胸腺指数、体质量和肠道黏膜 sIgA、IFN- γ 、IL-4 和 IFN- γ /IL-4 比值降低,CD3⁺细胞比例升高($P < 0.05$),大鼠出现腹泻和大便干燥现象。另外,腹腔注射 CTX 可直接损伤实验小鼠肝脏和凝血功能,表现出凝血酶原时间、凝血酶时间和活化部分凝血活酶时间延长,血浆纤维蛋白原增多,淋巴细胞、血小板、白细胞和中性粒细胞减低;其中,对电解质的影响以钾离子降低和氯离子升高为主,且与药物剂量和用药时间关系紧密^[26-29]。由此推断:①CTX 对大鼠免疫功能的抑制使机体抗病能力降低,更易受外界病原体侵袭出现机会性感染;②CTX 所致凝血功能异常可能是我们实验中大鼠出现尿血、眼眶和鼻腔出血的重要原因;③CTX 对胃肠道细胞因子和血清电解质的影响均可能导致大鼠进食减少、体重降低甚至出现腹泻或大便干燥等异常;反之,注射 CTX 后大鼠出现腹泻和摄食减少亦可加重电解质紊乱,使大鼠出现精神萎靡,活动量减少等表现,恰与本实验大鼠表现一致。

本实验通过对雌性 SD 大鼠一次性腹腔注射 CTX (剂量为 90 mg/kg)发现大鼠出现不良反应较多,死亡率较高,造模后第一周死亡率为 8%(4/50),略低于文献报道的 12%(6/50)^[30],但于灌胃前总死亡率为 24%(12/50),通过检查腹腔注射部位,未见红肿、渗血及渗液等感染迹象。为减少由腹腔注射 CTX 所引起的不良反应,降低大鼠死亡率,Wang XH 等^[31]研究发现,CTX 腹腔注射前予以桦木酸预处理可降低小鼠肠道中丙二醛(MDA)和还原型谷胱甘肽(GSH)的含量,抑制超氧化物歧化酶(SOD)活性;并且桦木酸可显著下调小鼠血清促炎细胞因子 IL-5、IL-17、IL-12 和

TNF- α 水平,通过增强 ZO-1 和 Claudin-1mRNA 表达,以改善由 CTX 破坏的胃肠道物理和免疫屏障,增强抗炎和抗氧化效果。此外,维生素 E 作为天然的抗氧化剂可通过降低 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 水平,改善 CTX 对大鼠肝脏产生的氧化应激损伤和炎症反应,促进氧化应激标志物(SOD、GPX、CAT 和 MDA)和肝功能标志物(ALT、AST、ALP)恢复正常^[32-33]。

然而,本研究尚存以下不足:①大鼠死亡后易出现溶血现象,无法通过血液检测方法评估大鼠肝肾功能、电解质及免疫功能状况,使重要脏器的病理形态学结果作为证据较单一且缺乏特异性;②对照组大鼠和造模组大鼠数量差异较大,不排除由于对照组大鼠样本量小而出现统计学结果偏倚,尚需大样本实验研究支持;③本实验大鼠死亡时间有差异,不排除注射 CTX 后因大鼠个体差异对药物产生的副作用表现不明显或趋于自愈情况,造成本实验所观察结果不能反映所有大鼠的真实状况;④未使用代谢笼单独饲养大鼠,无法准确评估每只大鼠摄食和饮水量变化,也无法获取其代谢情况,使支持本实验结果的数据不够丰富;⑤未对照注射不同剂量或于不同时间注射 CTX 对意外死亡大鼠的影响,也没有对照同一剂量对不同周龄或不同品系和级别大鼠的影响;⑥我们后续实验改用 75 mg/kg 剂量造模,发现大鼠出现的不良反应及死亡率明显下降,但由于缺乏同期对照研究,故无法说明不同 CTX 注射剂量对本实验大鼠意外死亡产生影响。

4 结论

通过病理 HE 染色观察意外死亡大鼠重要脏器,发现大鼠肺组织充血、水肿明显;胃组织浅表黏膜糜烂。尽管以上因素可能不是大鼠致死的直接原因,但不排除上述病变分别是本实验大鼠出现异常呼吸,进食减少和体重降低的重要原因。因此,为使本实验更具科学性,后期可将一次性腹腔注射 CTX 诱导 DOR 模型法中大鼠死亡原因为实验思路,进行深入的相关课题研究,并将血液检测结合病理学结果进行分析大鼠意外死亡原因,提前干预由腹腔注射 CTX 所诱发的一系列“脱靶效应”,对比是否采取相应干预措施后能降低或避免由药物所致的大鼠死亡,为提高造模大鼠生存质量,降低不良反应及死亡率极具重要的现实意义。

参考文献:

- [1] Ata B, Seyhan A, Seli E. Diminished ovarian reserve versus ovarian aging: overlaps and differences[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2019, 31(3): 139-147.
- [2] Tang RY, Yu Q. The significance of FMR1 CGG repeats in Chinese women with premature ovarian insufficiency and diminished ovarian reserve[J]. Reprod Biol Endocri-

- nol,2020,12,18(1):82.
- [3] Pastore LM, Christianson MS, Stelling J, et al. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35(1):17-23.
- [4] Jiang M, Wang WL, Zhang JX, et al. Protective effects and possible mechanisms of actions of bushen cuyun recipe on diminished ovarian reserve induced by cyclophosphamide in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:546.
- [5] Huang C, Song KK, Ma WW, et al. Immunomodulatory mechanism of Bushen Huoxue Recipe alleviates cyclophosphamide-induced diminished ovarian reserve in mouse model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 208:44-56.
- [6] Xia T, Fu Y, Li S, et al. Bu Shen Tiao Chong recipe restores diminished ovary reserve through the BDNF pathway [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33(6):795-805.
- [7] 陆星星, 任豆豆, 徐华洲, 等. 资益益冲方对卵巢储备功能下降模型大鼠卵巢氧化损伤的影响及其作用机制 [J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(7):561-568.
- [8] 刘慧莹, 任春娥, 姜爱芳. 两种造模方法导致大鼠卵巢早衰模型的比较研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(28):4869-4872.
- [9] 张飒, 高慧, 徐文君, 等. 环磷酰胺致大鼠卵巢储备功能低下的模型对照研究 [J]. *中医药临床杂志*, 2018, 30(1):100-104.
- [10] 赵颖, 章勤. 何氏养巢颗粒对 DOR 小鼠卵巢储备功能的影响 [J]. *浙江临床医学*, 2019, 21(11):1479-1481.
- [11] Zhu SP, Wang YS, Chang XX, et al. The protective effect of pre-Moxibustion on reproductive hormones profile of rats with tripterygium glycosides-induced ovarian damage [J]. *Complement Med Res*, 2020, 27(6):401-409.
- [12] Ozatik FY, Ozatik O, Yigitaslan S, et al. Do resveratrol and dehydroepiandrosterone increase diminished ovarian reserve? [J]. *Eurasian J Med*, 2020, 52(1):6-11.
- [13] 艾浩, 牛建昭, 薛晓鸥, 等. 化疗损伤性卵巢功能早衰小鼠动物模型的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(1):35-38, 封 3.
- [14] 黄雪君, 孙冬梅, 陈玉兴, 等. 护卵颗粒对重复制动应激致卵巢功能减退模型大鼠的影响 [J]. *世界中医药*, 2016, 11(3):502-506.
- [15] 李琴, 张小琴, 敖洪峰, 等. 高压氧暴露对慢性应激所致卵巢功能减退模型大鼠的激素水平和 TGF- β 1, Smad3 表达影响 [J]. *华南国防医学杂志*, 2019, 33(6):371-375.
- [16] Stringer J, Groenewegen E, Liew SH, et al. Nicotinamide mononucleotide does not protect the ovarian reserve from cancer treatments [J]. *Reproduction*, 2019, 1:REP-19-0337. R2.
- [17] 李丽美, 陶莉莉, 和秀魁, 等. 环磷酰胺建立 SD 大鼠卵巢功能减退模型的研究 [J]. *重庆医学*, 2019, 48(13):2180-2183, 2188.
- [18] Luan Y, Edmonds ME, Woodruff TK, et al. Inhibitors of apoptosis protect the ovarian reserve from cyclophosphamide [J]. *J Endocrinol*, 2019, 240(2):243-256.
- [19] 魏天琴, 凌丽, 冯秀山, 等. 环磷酰胺对大鼠卵巢结构与功能的影响及机制 [J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43(3):195-200.
- [20] Nguyen QN, Zerafa N, Liew SH, et al. Loss of PUMA protects the ovarian reserve during DNA-damaging chemotherapy and preserves fertility [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6):618.
- [21] Bellusci G, Mattiello L, Iannizzotto V, et al. Kinase-independent inhibition of cyclophosphamide-induced pathways protects the ovarian reserve and prolongs fertility [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10):726.
- [22] Zhang BF, Hu YX, Liu XY, et al. Correction: The role of AKT and FOXO3 in preventing ovarian toxicity induced by cyclophosphamide [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4):e0215616.
- [23] Nguyen QN, Zerafa N, Liew SH, et al. Cisplatin- and cyclophosphamide-induced primordial follicle depletion is caused by direct damage to oocytes [J]. *Mol Hum Reprod*, 2019, 25(8):433-444.
- [24] Maman E, Prokopis K, Levron J, et al. Does controlled ovarian stimulation prior to chemotherapy increase primordial follicle loss and diminish ovarian reserve? An animal study [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(1):206-210.
- [25] Wang ZY, Li YH, Wang CJ, et al. Oral administration of *Urtica macrorrhiza* Hand.-Mazz. polysaccharides to protect against cyclophosphamide-induced intestinal immunosuppression [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(3):2178-2186.
- [26] 熊国林, 邢爽, 申星, 等. 不同剂量环磷酰胺对正常 ICR 小鼠外周血象的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(5):1493-1496.
- [27] 李嫻, 王娜, 卫向龙. 熟地黄炭补血止血作用的炮制机制探索 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(4):29-33.
- [28] 英永, 胡建廷, 李莉, 等. 环磷酰胺对雄鼠生长性能、外周血生化指标及脏器的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(10):18-21.
- [29] 何玉卓, 郭学军, 林晓燕, 等. 免疫抑制剂联合小剂量利妥昔单抗对获得性血友病 A 患者凝血功能及预后的影响 [J]. *右江民族医学院学报*, 2019, 41(4):391-395.
- [30] 赵晨凯. 归茸丸对 DOR 模型小鼠卵巢功能影响的实验研究 [D]. 武汉:湖北中医药大学, 2016.
- [31] Wang XH, Yuan ZH, Zhu LJ, et al. Protective effects of betulinic acid on intestinal mucosal injury induced by cyclophosphamide in mice [J]. *Pharmacol Rep*, 2019, 71(5):929-939.
- [32] Abdelfattah-Hassan A, Shalaby SI, Khater SI, et al. Panax ginseng is superior to vitamin E as a hepatoprotector against cyclophosphamide-induced liver damage [J]. *Complement Ther Med*, 2019, 46:95-102.
- [33] 孙军培, 杜丹丽, 张燕, 等. 蚕茸柱天胶囊联合维生素 E 对不育患者精子染色质损伤及氧化应激的影响 [J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(5):592-596.

收稿日期:2021-10-02;修回日期:2021-10-30