王海丹,郭红玉,马蔚蓉,等. 自身免疫型卵巢早衰模型的研究［J］. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 563-569.
Wang HD, Guo HY, Ma WR, et al. Study of a model of autoimmune premature ovarian failure［J］. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 563-569.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.001

自身免疫型卵巢早衰模型的研究

王海丹*,郭红玉,马蔚蓉,王琼,严士海,符蕊

(南京中医药大学附属医院江苏省中医院,南京　210029)

【摘要】 **目的**　为了更好地建立自身型卵巢早衰模型,采用不同的造模时间和佐剂观察 ZP_3 诱导的免疫型卵巢早衰模型建立的相关因素。**方法**　将动情周期正常的 B6AF1 小鼠,随机分为正常组、模型 A 组、模型 B 组、模型 C 组、模型 D 组。造模结束后取小鼠血清检测性激素,取卵巢观察病理改变、透明带的变化、颗粒细胞的凋亡。**结果**　除模型 A 组外,其余 3 组均表现出动情周期紊乱、高促性腺激素低雌激素、闭锁卵泡增多、透明带明显、卵巢凋亡细胞增多的现象,与各组相比模型 C 组和 D 组在闭锁卵泡数量、卵巢凋亡细胞和透明带的变化上更加明显。**结论**　ZP_3 诱导可造成免疫型卵巢早衰,其中 3 次免疫的两组成模效果更好,成模率在 80%,可作为今后建模的参考。

【关键词】 免疫型卵巢早衰;模型建立;透明带抗原;B6AF1 小鼠
【中图分类号】Q95-33　【文献标识码】A　【文章编号】1005-4847(2021) 05-0563-07

Study of a model of autoimmune premature ovarian failure

WANG Haidan*, GUO Hongyu, MA Weirong, WANG Qiong, YAN Shihai, FU Rui

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Corresponding author: WANG Haidan. E-mail: danielwhd1984@sina.com

【**Abstract**】 **Objective**　To improve a mouse model of autoimmune premature ovarian failure, different modeling times and adjuvant were used to determine factors related to induction of premature ovarian failure by zona pellucida glycoprotein 3 (ZP3). **Methods**　B6AF1 mice with regular estrous cycles were randomly divided into five groups: normal, model A, model B, model C and model D groups. At the end of the experiment, serum was collected to detect sex hormones, and ovaries were collected to observe pathological changes, including effects on the zona pellucida and apoptosis of ovarian cells. **Results**　Compared with the normal group, the model B, C and D groups showed estrous cycle disorders, including high gonadotropin and low estrogen levels, increased follicle atresia, obvious zona pellucida and increased apoptosis of ovarian apoptotic cells. The model C and model D groups had more obvious changes in the number of atretic follicles, ovarian apoptotic cells and zona pellucida. **Conclusions**　In ZP3 induced autoimmune premature ovarian failure, the two-component model with three times immunization produced a stronger effect, and the modeling rate was 80%, which can be used as a reference for future modeling.

【**Keywords**】 autoimmune premature ovarian failure; model; zona pellucida antigen; B6AF1 mice
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目]国家自然科学基金青年基金项目(81804131)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China(81804131).
[作者简介]王海丹(1984—),女,副主任药师,硕士,研究方向:妇科药理学。Email:danielwhd1984@sina.com

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是一种常见的妇科疾病,其特征是 40 岁以前出现卵巢功能衰退,伴随着闭经、血清高促性腺激素和低雌激素的症状[1]。它是早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)的终末阶段[2],对育龄妇女来说从身体和精神上都是伤害,不仅有围绝经期带来的痛苦,还会导致生育力下降或丧失,认知力下降,缺血性心脏病、骨质疏松、自身免疫性等疾病[3-4],身体和精神上的改变严重影响妇女及其家人的身心健康和生活质量。卵巢功能不全的原因很多,比如:自身免疫因素、遗传基因、环境和生活方式、心理压力、药物化学因素等[5-6]。自身免疫异常是比较重要的因素之一,约 5% ~ 30%的 POF 病例有自身免疫病因[7-8]。40 多年前,卵巢组织就被证实是免疫系统的一个靶向器官[9]。但目前免疫性卵巢早衰的发病机制、有效的检测及治疗方法还在进一步探索之中。本文通过比较采用不同的造模时间和不同佐剂观察小鼠透明带多肽抗原诱导的免疫性卵巢早衰模型建立的相关因素,为高效高质量地建立免疫性卵巢早衰模型提供了一定的参考,为研究药物对免疫性卵巢早衰的作用机制提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 8 周龄 SPF 级健康雄性 A/J 小鼠,体重 18 ~ 22 g,购于江苏集萃药康生物科技有限公司【SCXK(苏)2019-0009】。24 只 8 周龄 SPF 级健康雌性 C57BL/6 小鼠,体重 18 ~ 22 g,购于斯贝福生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。将A/J雄鼠和 C57BL/6 雌鼠进行交配,繁育出 B6AF1 小鼠,7 周龄时将所繁育的雌性小鼠查 1 周动情周期变化,筛选出具有正常动情周期的 B6AF1 小鼠 50 只,体重 18 ~ 22 g。饲养于江苏省中医院实验动物中心【SYXK(苏)2017-0069】。实验小鼠在 SPF 级环境分笼饲养,温度为(20 ± 2)℃,相对湿度维持在 45% ~ 65%,照明 12 h 更替,自由饮水饮食。所有操作均符合南京中医药大学附属医院实验动物伦理要求(审批号:2019DW-09-02)。

1.1.2 主要试剂与仪器

小鼠透明带多肽粉末:小鼠透明带 3(ZP_3)的第 330 ~ 342 个氨基酸序列(NSSSSQFQIHGPR),分析纯度 96.91%(由上海吉尔生化有限公司生产,Catalog:271036);弗氏完全佐剂 a(每毫升含有 1 mg 结核分枝杆菌 TB)(sigma 公司,Lot#SLBT1714);弗氏不完全佐剂 a(sigma 公司,批号:SLBT0114);弗氏完全佐剂 b(每毫升含有 5 mg 结核分枝杆菌 TB)(美国 Chondrex 公司,LOT:200010);弗氏不完全佐剂 b(美国 Chondrex 公司,LOT:200079);E_2 试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号:20201015);FSH 试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号:20201016);Tunel 试剂盒(Servicebio 公司,批号:G1501);Donkel 试剂盒(Servicebio 公司,批号:SA00013-5);DAPI(Servicebio 公司,批号:G1012);全自动放免计数仪(西安 核仪器厂);NIKON ECLIPSE C1 正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);Nikon DS-U3 成像系统(日本 Nikon 公司);离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及模型建立

将动情周期正常的 B6AF1 小鼠随机分为 5 组:正常组、模型 A 组、模型 B 组、模型 C 组、模型 D 组。将浓度为 1 mmol/L 的 ZP_3 溶液与弗氏完全佐剂 a 和弗氏不完全佐剂 a 分别按 1∶1体积比例配制成免疫试剂 a 和免疫强化试剂 a,与弗氏完全佐剂 b 和弗氏不完全佐剂 b 分别按 1∶1体积比例配制成免疫试剂 b 和免疫强化试剂 b。造模均为尾根部皮下多点注射。正常组小鼠每次免疫时每只给予 0.15 mL 生理盐水。模型 A 组和模型 B 组分别单次注射 0.15 mL 免疫试剂 a 和免疫试剂 b,2 周后取材。模型 C 组和模型 D 组小鼠首次免疫时每只分别给予 0.15 mL 免疫试剂 a 和免疫试剂 b,14 d 后每只鼠分别给予 0.15 mL 免疫强化试剂 a 和免疫强化试剂 b 进行第 2 次免疫,28 d 后进行第 3 次免疫,操作同第 2 次。第 3 次免疫后 1 周取材[10]。

1.2.2 取材及检测

每天定时用预吸有生理盐水的吸管轻轻插入小鼠阴道,取分泌物细胞,将有阴道分泌物细胞的液体滴入细胞板,在显微镜下观察细胞形态,记录小鼠动情周期变化[11]。实验末各组小鼠取血清,按试剂盒说明采用全自动放免计数仪检测小鼠血清 E_2、FSH 水平。取单侧卵巢组织,HE 染色观察卵巢各级卵泡、闭锁卵泡、黄体的变化。荧光 tunel 法检测卵巢细胞凋亡情况,按照以下步骤进行:石蜡切片脱蜡至水、蛋白酶 K 修复、破膜、室温平衡、加反应液 TDT 酶,dUTP、DAPI 复染细胞核、封片、镜检拍照。荧光显微镜下观察 DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,试剂盒为 FITC 荧光素标记,阳性

凋亡细胞核为绿色。免疫荧光法检测卵巢透明带的变化,按照以下步骤进行:石蜡切片脱蜡至水、抗原修复、画圈血清封闭、加一抗 Donkel、DAPI 复染细胞核、淬灭组织自发荧光、封片、镜检拍照。荧光显微镜下观察 DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,阳性表达为 Donkel 荧光素标记的绿光。

1.2.3　造模成功判定指标和鉴定方法

从动情周期变化、性激素水平、卵巢组织病理变化、卵巢颗粒细胞凋亡以及透明带变化来判定造模成功与否。如果同时出现动情周期紊乱;低雌激素高促卵泡刺激素水平;卵巢病理呈现初级、次级、成熟卵泡率变少,闭锁卵泡率上升;卵巢颗粒细胞凋亡率上升;透明带呈现亮色荧光圈;并且以上各项指标与正常组比较差异具有显著性的组别就判定为造模成功。

1.3　统计学分析

所有统计计算均用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析,所有数据皆以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验,$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。凋亡率统计采用 Image J 软件分析。

2　结果

2.1　小鼠动情周期变化

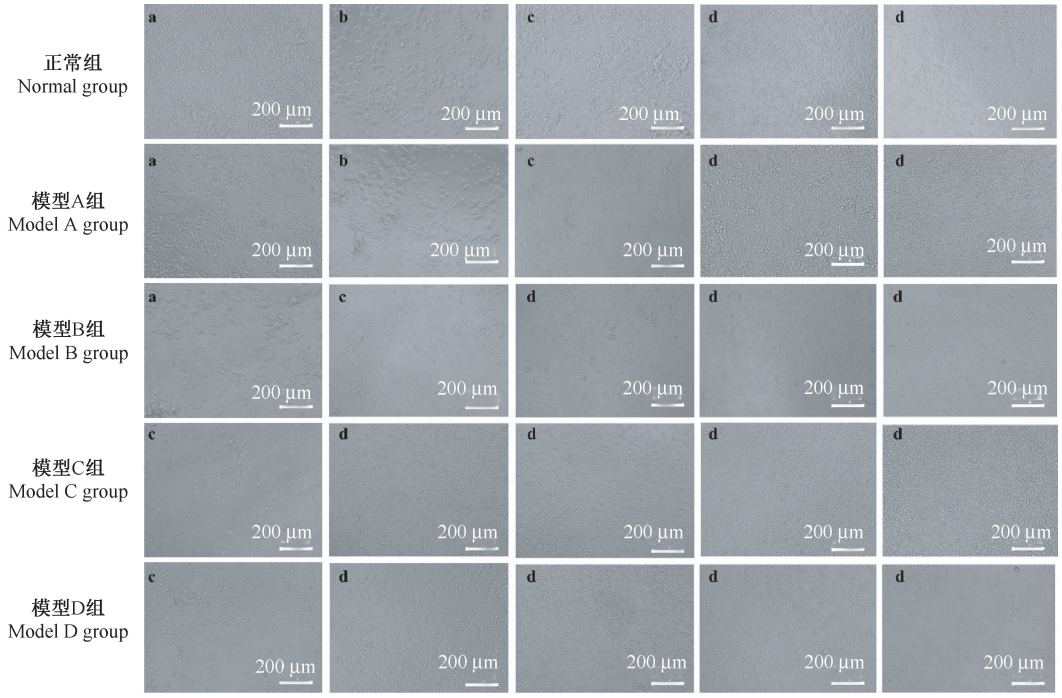
正常组和模型 A 组小鼠以动情前期、动情期、动情后期、动情间期的规律呈现 5 ~ 6 d 的 1 个循环。模型 B 组小鼠造模 1 周后呈现动情周期紊乱,但是各期还是呈现 5 ~ 6 d 的规律,只是动情后期和动情间期延长。模型 C 组和模型 D 组均在第 3 次免疫后呈现出明显的动情周期紊乱,80%的小鼠一直处于动情后期和动情间期,模型 C 组和模型 D 组比较差异无显著性($P > 0.05$)(见图 1)。

2.2　血清 E_2、FSH 水平变化

与正常组相比,模型 B 组小鼠 E_2 水平明显降低,FSH 水平明显增加,与正常组比,差异具有显著性($P < 0.05$)。模型 C 组和模型 D 组小鼠 E_2 水平显著降低,FSH 水平显著增加,与正常组比,差异具有显著性($P < 0.01$)。模型 A 组小鼠血清 E_2、FSH 水平与正常组比较差异无显著性($P > 0.05$),模型 C 组和模型 D 组小鼠血清差异无显著性($P > 0.05$)(见表 1)。

2.3　小鼠卵巢组织形态学的变化

正常组卵巢皮质区各级卵泡、黄体相间分布,



注:a:动情前期:大部分是有核上皮细胞,也有少许角化上皮细胞,无白细胞;b:动情期:全部是角化细胞或偶有少许上皮细胞;c:动情后期:有核上皮细胞、白细胞、角化细胞均有;d:动情间期:大部分是白细胞及少许上皮细胞和粘液。

图 1　小鼠动情周期细胞变化

Note. a. Pre-estrus. Most of them are nucleated epithelial cells, but there are a few keratinized epithelial cells, no white blood cells. b. Estrous phase. All keratinocytes or a few epithelial cells occasionally. c. Late estrus. Nucleated epithelial cells, white blood cells and keratinocytes. d. Interestrous phase. Mostly white blood cells and a few epithelial cells and mucus.

Figure 1　Changes of estrous cycle cells in mice

比例正常。模型 A 组和 B 组初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡的比例有所下降,闭锁卵泡有上升趋势,但与正常组比较,初次级卵泡率、成熟卵泡率、闭锁卵泡率差异无显著性($P > 0.05$)。模型 C 组和 D 组卵巢皮质多见黄体和闭锁卵泡,少见初级和次级卵泡,成熟卵泡基本未见或个别偶见,与正常组比较,模型 C 组和 D 组初次级卵泡率、成熟卵泡率、闭锁卵泡率差异有显著性($P < 0.01$, $P < 0.05$),模型 C 组和 D 组之间比较差异无显著性($P > 0.05$)(见图 2,表 2)。

2.4 小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的变化

正常组、模型 A、B、C、D 组卵巢颗粒细胞凋亡率分别为 8.15%、10.21%、11.18%、35.49%、36.89%。模型组 C 组、D 组颗粒细胞凋亡率明显高于正常组,差异具有显著性($P < 0.05$)。模型 A 组、B 组颗粒细胞凋亡率有升高趋势,但是与正常组比较,差异无显著性($P > 0.05$)(见图 3,表 3)。

2.5 小鼠卵巢透明带的变化

正常组卵巢未见透明带呈现很亮的绿光圈,模型各组卵巢可见明显的透明带绿色荧光,其中模型 C 组、D 组透明带荧光更明显,颜色更亮(见图 4)。

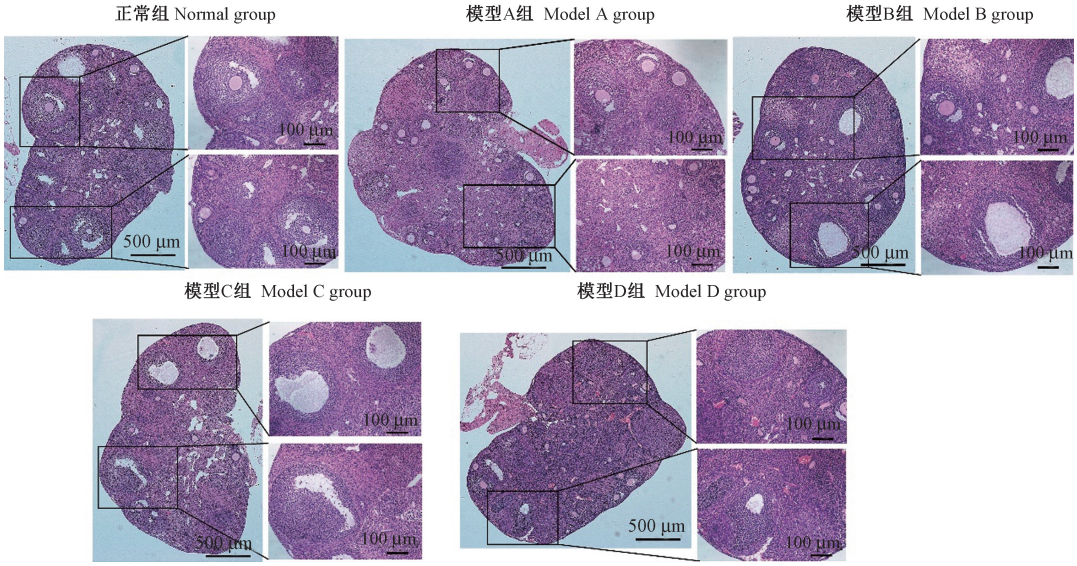
表 1 ZP_3 致卵巢早衰小鼠血清 E_2、FSH 水平变化($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Changes of serum E_2 and FSH levels in mice with premature ovarian failure induced by ZP_3($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别 Groups	造模方式 Modeling method	E_2(pg/mL)	FSH(mIU/mL)
正常组 Normal group	等量生理盐水 NS	33.31 ± 5.21	8.80 ± 1.48
模型 A 组 Model A group	1 次免疫 + 1 mg/mL TB Primary immunization + 1 mg/mL TB	31.45 ± 10.95	10.27 ± 2.10
模型 B 组 Model B group	1 次免疫 + 5 mg/mL TB Primary immunization + 5 mg/mL TB	27.63 ± 4.17*	13.29 ± 4.51*
模型 C 组 Model C group	3 次免疫 + 1 mg/mL TB Tertiary immunization + 1 mg/mL TB	23.88 ± 3.68**	15.31 ± 4.28**
模型 D 组 Model D group	3 次免疫 + 5 mg/mL TB Tertiary immunization + 5 mg/mL TB	23.43 ± 5.36**	12.68 ± 2.13**

注:与正常组比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$。(下表同)

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following tables)



注:卵巢完整组织学结构;卵巢局部组织学结构。

图 2 小鼠卵巢组织形态学的变化

Note. Complete histological structure of ovary. Local histological structure of ovary.

Figure 2 Morphological changes of ovarian tissue in mice

表 2　ZP_3 致卵巢早衰小鼠卵巢组织形态学变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2　Morphological changes of ovarian tissue in mice with premature ovarian failure induced by ZP_3($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	造模方式 Modeling method	初次级卵泡率(%) Primary and secondary follicles rate(%)	成熟卵泡率(%) Mature follicles rate(%)	闭锁卵泡率(%) Occluded follicles rate(%)
正常组 Normal group	等量生理盐水 NS	56.24 ± 20.91	5.17 ± 2.95	38.59 ± 18.94
模型 A 组 Model A group	1 次免疫 + 1 mg/mL TB Primary immunization + 1 mg/mL TB	40.10 ± 19.26	3.48 ± 6.48	56.42 ± 21.99
模型 B 组 Model B group	1 次免疫 + 5 mg/mL TB Primary immunization + 5 mg/mL TB	36.36 ± 14.28	4.53 ± 4.52	59.11 ± 16.64
模型 C 组 Model C group	3 次免疫 + 1 mg/mL TB Tertiary immunization + 1 mg/mL TB	28.42 ± 16.10*	1.39 ± 2.50*	70.20 ± 15.25**
模型 D 组 Model D group	3 次免疫 + 5 mg/mL TB Tertiary immunization + 5 mg/mL TB	32.20 ± 10.11*	1.39 ± 2.38*	66.40 ± 10.58**

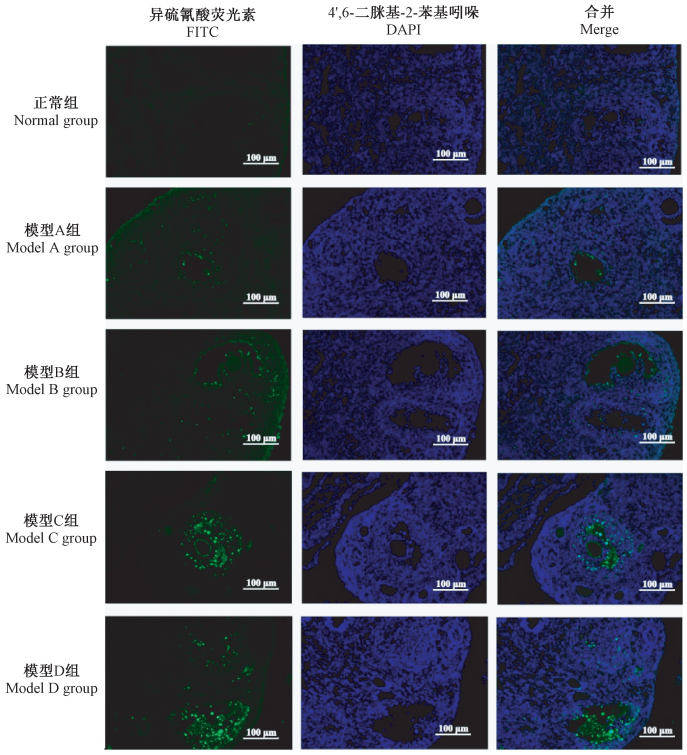
表 3　ZP_3 致卵巢早衰小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的变化($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3　Changes of apoptosis of ovarian granulosa cells in mice with premature ovarian failure induced by ZP_3($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Groups	造模方式 Modeling method	凋亡率(%) Apoptosis rate(%)
正常组 Normal group	等量生理盐水 NS	8.15 ± 0.99
模型 A 组 Model A group	1 次免疫 + 1mg/mL TB Primary immunization + 1mg/mL TB	10.21 ± 1.08
模型 B 组 Model B group	1 次免疫 + 5mg/mL TB Primary immunization + 5mg/mL TB	11.18 ± 2.15
模型 C 组 Model C group	3 次免疫 + 1mg/mL TB Tertiary immunization + 1mg/mL TB	35.49 ± 1.93**
模型 D 组 Model D group	3 次免疫 + 5mg/mL TB Tertiary immunization + 5mg/mL TB	36.89 ± 2.71**

注:与正常组比,** $P < 0.01$。

Note. Compared with normal group, ** $P < 0.01$.

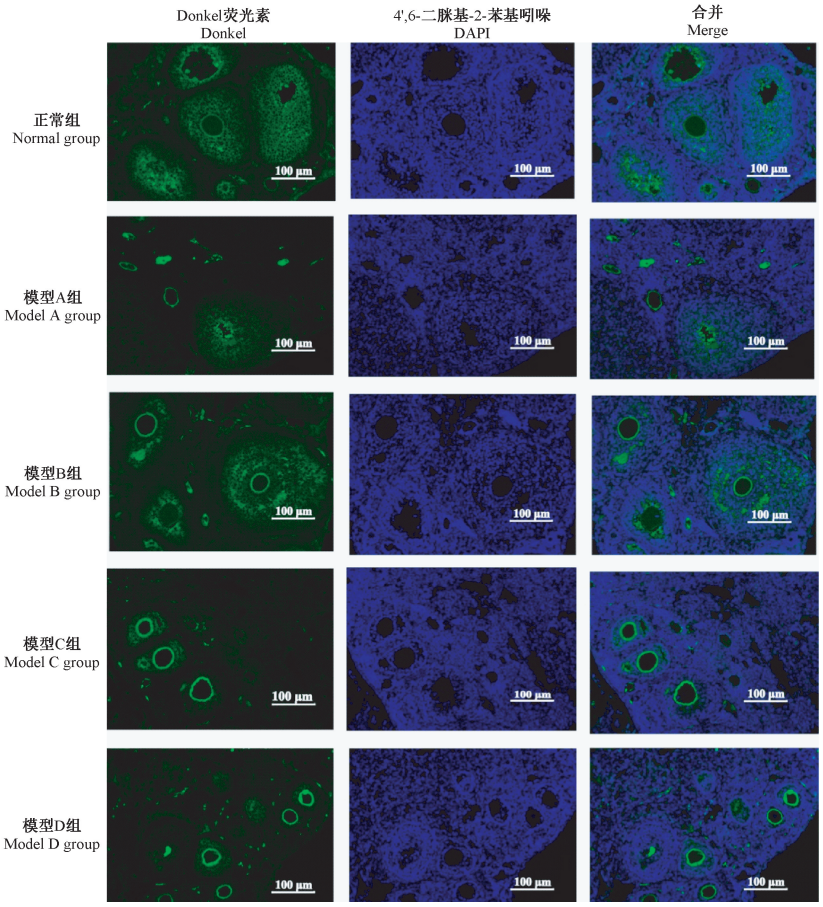


注:荧光 Tunel 检测卵巢颗粒细胞凋亡;DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,阳性凋亡细胞核为绿色。

图 3　小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的变化

Note. Apoptosis of ovarian granulosa cells was detected by fluorescence TUNEL. Under UV excitation, the DAPI-stained nuclei were blue, while the apoptotic nuclei were green.

Figure 3　Changes in apoptosis of mouse ovarian granulosa cells



注:免疫荧光法检测小鼠卵巢组织透明带变化;DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,阳性表达为 Donkel 荧光素标记的绿光。

图 4 小鼠卵巢组织透明带的变化

Note. The zona pellucida of mice ovary was detected by immunofluorescence assay. The DAPI-stained nuclei were blue under UV excitation and the positive expression was green light labeled with Donkel luciferin.

Figure 4 Changes of zona pellucida in mouse ovarian tissue

3 讨论

随着 POF 临床发病率的上升,寻求有效的 POF 治疗方案,尤其是针对其发病机制的靶向治疗,最终改善其卵巢功能,已成为亟待解决的难题[12-13]。而对于 POF 基础研究来说,建立一个有效的 POF 动物模型尤为重要。POF 动物模型根据不同的因素有几种不同的造模方式[14-15],比如直接基因敲除,但是这类动物成本和饲养标准较高。胸腺切除也可导致卵巢早衰,但是手术复杂,在上个世纪有报道,但是近年来不常采用[16]。半乳糖造模周期很长[17],雷公藤和环磷酰胺等其他化疗药物造模虽耗时较短[18],造模药物易获,费用低但同时会带来早衰外的不良反应。

透明带蛋白 ZP_3 被称作是初级精子受体,它是哺乳动物环绕在卵母细胞的外衣,能够影响卵泡各个发育阶段的透明带的合成,与卵母细胞成熟有直线相关的关系。用 ZP_3 蛋白建立的 POF 动物模型与人类卵巢早衰具有相似的生殖内分泌和组织学变化,因此已成为近年来 POF 造模最重要及可靠的方法[19-20]。通过给予透明带多肽抗原,使动物体内产生抗透明带的抗体,从而建立免疫性卵巢早衰的模型。在建立的过程中,为了加强抗原的免疫效果会用弗氏完全佐剂进行免疫,采用 ZP_3 多肽抗原作为造模剂是学者的共识,但在弗氏完全佐剂(结核分枝杆菌浓度不同)的选择和免疫干预时间上还不明确,所以本研究组针对不同的造模时间和不同佐剂进行了深入研究。研究发现单次以低浓度结核分枝杆菌的弗氏完全佐剂免疫动物,从血清性激素水平,卵巢病理改变、颗粒细胞的凋亡和透明带抗体变化这几个方面分析,检测结果不符合 POF 模型动物的特点。单次免疫高浓度弗氏完全佐剂后动物血清呈现低雌激素和高促性腺激素的变化,透明带抗体荧光也有出现,但是在卵巢组织病理学和颗粒细胞

凋亡方面与正常组相比变化不明显。高浓度的佐剂虽然增强了免疫的反应,但是免疫细胞并未继续浸润和破坏颗粒细胞,使颗粒细胞层并未继续逐渐减少,所以未见组织病理学和颗粒细胞的改变。因此表明单次免疫不能完全达到 POF 动物模型的要求。由结果可见,在第 1 次 ZP_3 免疫后继续加强免疫 2 次后,小鼠出现动情周期紊乱、高促性腺激素低雌激素、闭锁卵泡增多、透明带荧光显著、卵巢凋亡细胞增多的现象,这些结果完全符合 POF 模型动物的特征。在同样 3 次免疫的情况下,弗氏完全佐剂里结核分枝杆菌浓度的高低未见显著性的差异。

综上所述,ZP_3 诱导可以成功建立免疫型卵巢早衰模型,其中以 3 次免疫的成模效果更佳,为今后的研究者构建卵巢早衰模型提供一定的基础。

参　考　文　献(References)

[1] Jankowska K. Premature ovarian failure [J]. Menopause Rev, 2017, 16(2): 51-56.

[2] European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency [J]. Hum Reprod, 2016, 31(5): 926-937.

[3] 张秀, 鲁雅, 王佩娟. 卵巢早衰的病因研究进展 [J]. 湖北中医药大学学报, 2017, 19(1): 118-120.
Zhang X, Lu Y, Wang PJ. Progress of study on pathogenesis of premature ovarian failure [J]. J Hubei Univ Chin Med, 2017, 19(1): 118-120.

[4] Slopień R, Warenik SA. Premature ovarian failure: diagnosis and treatment [J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2014, 41(6): 659-661.

[5] Wang XF, Zhang L, Wu QH, et al. Biological mechanisms of premature ovarian failure caused by psychological stress based on support vector regression [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 21393-21399.

[6] Yang Y, Huang W, Yuan L. Effects of environment and lifestyle factors on premature ovarian failure [J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1300: 63-111.

[7] Silva CA, Yamakami LY, Aikawa NE, et al. Autoimmune primary ovarian insufficiency [J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(4-5): 427-430.

[8] Ebrahimi M, Akbari AF. The role of autoimmunity in premature ovarian failure [J]. Iran J Reprod Med, 2015, 13(8): 461-472.

[9] Coulam CB, Ryan RJ. Premature menopause. I. Etiology [J]. Am J Obstet Gynecol, 1979, 133(6): 639-643.

[10] 朱玲, 罗颂平, 许丽绵, 等. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠抗卵巢抗体的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(4): 435-438.
Zhu L, Luo SP, Xu LM, et al. Influence of Zuogui pill on antiovarian antibodies in immune premature ovarian failure rats [J]. Modern J Integr Tradit Chin West Med, 2006, 15(4): 435-438.

[11] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2006.
Chen Q. Research methodology of pharmacology of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: People's Health Publishing House; 2006.

[12] Dang J, Jin Z, Liu X, et al. Human cord blood mononuclear cell transplantation for the treatment of premature ovarian failure in nude mice[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(3): 4122-4127.

[13] Barros F, Carvalho F, Barros A, et al. Premature ovarian insufficiency: clinical orientations for genetic testing and genetic counseling [J]. Porto Biomed J, 2020, 5(3): e62.

[14] 付莉, 赵怡璇, 李守柔. 卵巢早衰实验动物模型的建立 [J]. 生殖医学杂志, 2006, 15(3): 179-183.
Fu L, Zhao YX, Li SR. The establishment of the animal model of premature ovarian failure [J]. J Reprod Med, 2006, 15(3): 179-183.

[15] 苏先芝, 刘一斐, 孔文娟, 等. 三种早发性卵巢功能不全小鼠造模方法的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 725-732.
Su XZ, Liu YF, Kong WJ, et al. Comparison of three methods for the establishment of mouse models of premature ovarian insufficiency [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 725-732.

[16] Tong ZB, Nelson LM. A mouse gene encoding an oocyte antigen associated with autoimmune premature ovarian failure [J]. Endocrinology, 1999, 140(8): 3720-3726.

[17] 李洁, 杨菁, 陈媛, 等. D(+)半乳糖对小鼠卵巢功能影响的实验性研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(12): 98-100.
Li J, Yang J, Chen Y, et al. An experiment study: the effects of ovarian function in mice by D(+) galactose [J]. Chin J Birth Health Hered, 2006, 14(12): 98-100.

[18] 奚美丽, 鹿欣. 化疗对卵巢功能及生育功能影响研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2016, 43(4): 412-415.
Xi ML, Lu X. Ovarian dysfunction and fertility preservation in female cancer survivors after chemotherapy: a review [J]. J Int Obstet Gynecol, 2016, 43(4): 412-415.

[19] Zhang X, Zhang L, Li Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) promotes the recovery of ovarian function in a rat model of premature ovarian failure (POF) [J]. Gynecol Endocrinol, 2021, 37(4): 353-357.

[20] 张于念, 田海清, 腊晓琳. 免疫性卵巢早衰小鼠外周血 $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 细胞及其相关因子变化与 Tim-3 的关系 [J]. 山东医药, 2020, 60(2): 35-38.
Zhang YN, Tian HQ, La XL. Relationships between Tim-3 and $CD4^+$ $CD25^+$ Treg cells and its related factors in immune premature ovarian failure mice [J]. Shandong Med J, 2020, 60(2): 35-38.

[收稿日期]　2021-03-17