

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.34.008

骨髓间充质干细胞对环磷酰胺诱导卵巢损伤的保护作用*

左 侠^{1,2} 张 坤^{1,2} 王 懿³ 王明星⁴ 陈 蕾^{5△}

(1 第四军医大学 陕西 西安 710032; 2 西安市第四医院 陕西 西安 700004; 3 长安大学数学系 陕西 西安 710064;

4 中国人民解放军 96215 部队卫生队 广西 柳州 545616; 5 中国人民解放军海军总医院妇产科 北京 100048)

摘要 目的:研究骨髓间充质干细胞(MBSc)对注射环磷酰胺(CTX)引起的大鼠卵巢损伤的保护作用。**方法:**将 30 只 SD 大鼠按随机数字表随机分为三组,即对照组,模型组及细胞移植组,分别经尾静脉接受生理盐水,CTX 和 CTX+MBSc 移植。监测大鼠体重,动情周期的变化,用药结束后一周处死大鼠,测定血清雌二醇(E2),卵泡刺激素(FSH),黄体生成素(LH)的变化,观察各组大鼠卵巢形态学及卵泡数量变化,并利用原位细胞凋亡 TUNEL 法检测 3 组大鼠卵巢中细胞凋亡指数(AI)。**结果:**与对照组比较,模型组大鼠体重下降,动情周期延长,卵泡数量下降,E2 下降,FSH 及 LH 升高,组织细胞 AI 增加。与模型组比较,细胞移植组大鼠体重增加,动情周期缩短,卵泡数量增加,尤其是中大卵泡数增加,E2 上升,LH 下降,FSH 接近正常。**结论:**MBSc 移植能通过减少卵巢组织 AI 而在一定程度上减少环磷酰胺引起的卵巢功能损伤。

关键词:骨髓间充质干细胞;环磷酰胺;卵巢损伤;卵巢早衰

中图分类号:Q95-3;R711.75 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)34-6629-05

Protective Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation on Cyclophosphamide-Induced Ovarian Damage in Rat Model*

ZUO Xia^{1,2}, ZHANG Kun^{1,2}, WANG Yi³, WANG Ming-xing⁴, CHEN Lei^{5△}

(1 the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Xi'an No 4 hospital, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

3 College of science, Chang'an University, Xi'an, Shaanxi, 710064 China; 4 China PLA 96215 medical teams, Liuzhou, Guangxi, 545616, China; 5 Dept. of gynaecology and obstetrics, The naval general hospital, Beijing, 100048, China)

ABSTRACT Objective: To study the protective effects of bone marrow mesenchymal stem cells (MBSc) on cyclophosphamide (CTX)-induced ovarian injury in female rats. **Methods:** 30 SD rats were randomly divided into three groups (Control, Model, Trans) with random number table, which were treated by tail vein injection with normal saline, cyclophosphamide (CTX) and MBSc transplantation following CTX injection respectively. We observed body weights and estrous cycles of all rats during the experiment and harvested to check the content changes of serum concentration of estradiol (E2), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), and observed the histological and pathological changes, the follicle number and apoptosis of ovarian tissue on 7th day after drug withdrawal. **Results:** (1) The follicle number and serum concentration of E2 in rats of the Model group were lower than Control group, while the serum concentration of FSH and LH and AI in rats of the Model group were higher than Control group. (2) The body weight, the follicle number and serum concentration of E2 in rats of the Trans group were higher than Model group, while the serum concentration of FSH and LH and AI of rats in Trans group were lower than Model group. **Conclusions:** Transplantation of MBSc could reduce CTX-included injury of ovarian function by reducing AI of ovarian tissue.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Cyclophosphamide; Injury of ovarian function; Premature ovarian failure

Chinese Library Classification: Q95-3; R711.75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)34-6629-05

前言

随着恶性肿瘤治疗效果的不断提高,化疗引起的卵巢早衰(Premature ovarian failure, POF)已经成为危害恶性肿瘤后幸存妇女身心健康的严重问题。而目前仍没有有效的方法来恢复 POF 患者的卵巢功能^[1]环磷酰胺(Cyclophosphamide, CTX)是一种对卵巢毒性作用较强的化疗药物。它属于烷化剂,烷化基团可直接作用于 DNA 形成交叉连接或脱嘌呤,碱基错配,造成

DNA 结构和功能的损害,最终使细胞死亡或突变。这种细胞毒作用不仅作用于肿瘤细胞,还影响正常的体细胞和生殖细胞,引起一系列毒性反应^[2]。因此,CTX 在化疗中卵巢功能的保护作用非常重要^[3,4]。

骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, MBSc)在组织损伤修复方面的研究是 21 世纪的热点问题。MBSc 为多潜能性干细胞,体内分布广泛,免疫原性低,特定情况下可诱导分化,且可自体移植,避免移植排斥反应^[5]。目前研

* 基金项目:军队十二五科技攻关项目(CHJ11J105)

作者简介:左侠(1982-),女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:妇科内分泌,E-mail: zuoxia6219@163.com

△通讯作者:陈蕾,E-mail: chenleis@mail.tsinghua.edu.cn

(收稿日期:2014-05-08 接受日期:2014-05-30)

究发现 MBS_c对神经、心肌、肝、肺、肾等多种组织损伤具有修复功能^[9]。本实验通过对大鼠在应用环磷酰胺过程中移植 MBS_c, 观察其对大鼠卵巢功能及卵巢形态病理学的影响, 探讨其对卵巢功能的保护作用, 并通过凋亡监测初步探讨其保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SD 大鼠购自第四军医大学动物中心(质量合格证号: SCXK(军)2012-0007), 8 周左右, 体重 255 ± 12 g, 饲养于唐都医院神经外科实验室动物房, 喂食标准混合鼠饲料及自来水, 自由饮食, 温度控制在 22 ± 2 °C, 相对湿度 60 %, 保持 12:12 小时昼夜周期。隔日更换垫料。

1.1.2 主要试剂及仪器 L-DMEM 培养基(Gibco 公司)、胎牛血清(Gibco 公司)、胰蛋白酶、EDTA、环磷酰胺(江苏恒瑞), 防脱载玻片(深圳康乃馨生物), HE 染色剂(北京安柏定), 离心机(Saitexiangyi TDSA-WS), TUNEL 试剂盒(上海碧云天)。

1.2 实验方法

1.2.1 MBS_c 原代培养 取出生 14 天幼鼠, 脱颈处死后浸泡于 75 %酒精中 20 min, 放于超净台上培养皿中, 无菌下分离出双侧股骨及胫骨并移入另一培养皿中, 剔除股骨及胫骨周围软组织, PBS 冲洗 1 遍, 剪掉两端骨髓端, 用针管吸取 5 mL PBS 冲洗骨髓腔, 冲出组织放于离心管中离心(1000 rpm, 8 min), 离心后将沉淀的细胞重悬于含 10 %胎牛血清的完全培养液中, 调整细胞密度 2×10^6 个接种于 90 mm 塑料培养皿中。48 h 首次换液, 之后每 2-3 天换液一次, 7-10 天首次传代, 待贴壁细胞融合达 80 %后进行传代。一般 7-10 天首次传代。传代至第三代应用^[7]。

1.2.2 实验分组及给药方案 领回动物后适应性喂养一周, 选取性周期稳定在 4-5 天的大鼠纳入实验。按随机数字表随机分组。实验分 3 组。对照组: 每天 1 mL 生理盐水腹腔注射, 连续 15 天; 模型组: 于第一天给予负荷剂量 50 mg/kg CTX 溶于 1 mL 生理盐水中腹腔注射, 之后每天按 10 mg/kg 溶于 1 mL 生理盐水中进行腹腔注射, 连续注射 14 天。细胞移植组: 按模型组给药方案给予 CTX 腹腔注射^[9], 于第一次给药后 24 h 给予骨髓间充质干细胞尾静脉注射, 移植细胞密度 $5 \times 10^6/0.5$ mL。

1.2.3 处理方法 各组大鼠均于末次注药后一周处死, 处死前禁食 4 h 并称重大鼠体重。1 %戊巴比妥按 0.3-0.5 mL/kg 进行麻醉, 经心脏取血, 室温静置 2 h, 离心机 2000 rpm, 4 °C 离心 20 min, 离心 2 次, 血清置于 -70 °C 保存以检测相关指标。剖腹取卵巢, 置于中性福尔马林液中固定。

1.3 观察指标

1.3.1 一般情况 观察各组大鼠进食、活动情况; 给药时每日测

体重 1 次, 给药结束后于处死当日测体重。

1.3.2 各组大鼠动情周期变化 给药后每日 8:00 进行阴道涂片检查, 观察比较动情周期变化。动情周期阴道涂片特点^[9], 动情前期: 分泌物少, 有核上皮细胞为主, 偶有少量角化细胞; 动情期: 大量无核角化细胞或间有少量上皮细胞; 动情后期: 分泌物厚多, 白细胞、角化细胞、有核上皮细胞均有; 动情间期: 大量白细胞为主。

1.3.3 卵巢功能观察指标 (1) 卵泡计数, 卵巢组织经过常规石蜡包埋, 连续性 6 μ m 切片, 每隔 10 张取一张, 进行 HE 染色, 光学显微镜下计数总卵泡数量, 小卵泡及中大卵泡数量并计算小卵泡及中大卵泡所占比例。直径小于 30 μ m 的卵泡为小卵泡, 直径大于 30 μ m 的为中大卵泡^[10]。

(2) 性激素检测, 采用放射免疫法检测 E₂、FSH 及 LH, 严格按照试剂盒说明进行操作。

1.3.4 卵巢组织形态学 卵巢组织经过常规石蜡包埋, 6 μ m 切片行 HE 染色, 然后在光学显微镜下观察卵巢组织病理学变化。

1.3.5 TUNEL 原位细胞凋亡检测 采用 TUNEL 原位细胞凋亡检测法(荧光法), 石蜡切片于二甲苯中脱蜡 8 min。换用新鲜的二甲苯, 再脱蜡 8 min; 依次无水乙醇、95 %乙醇、90 %乙醇、85 %乙醇、80 %乙醇、70 %乙醇 2 min 水合; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入 20 μ g/mL 蛋白酶 K 33 °C 孵育 20 min; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 注意这一步必须把蛋白酶 K 洗涤干净, 否则会严重干扰后续的标记反应; 3 %过氧化氢室温封闭 10 min; PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min; 每个样本加入 TUNEL 检测液 50 μ L, 于湿盒中 37 °C 避光湿润反应 60 min; PBS 洗涤 3 次。用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。激发波长为 550 nm, 发射波长为 570 nm(红色荧光)。采用细胞凋亡指数(AI)来评估细胞凋亡的程度, AI 为每 500 个细胞核中阳性细胞核的数目。

1.4 统计学方法

实验数据以表示, 采用 SPSS 18.0 统计软件处理, 各组比较用单向方差分析(One way ANOVA), 组间差异用 Dunnett T3 法分析。

2 结果

2.1 一般情况

各组给药前体重无明显差别($P > 0.05$); 给药后对照组大鼠体重稳定增长, 毛色白而有光泽, 进食好; 模型组大鼠体重下降明显, 毛色灰暗, 无光泽, 进食量极少, 很少活动; 细胞移植组进食量及活动量减少不明显, 化疗前后体重略有增加。与对照组比较, 模型组给药后体重明显下降($P < 0.05$); 与模型组比较, 细胞移植组给药后体重增加($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠体重变化情况($\bar{x} \pm s$, g)

Table 1 Changes of body weight ($\bar{x} \pm s$, g)

Group	Numbers of rats	Body weight(g)		Weight difference(g)
		Before drug	After administration	
Control	10	254.0 $\pm$ 10.6	277.6 $\pm$ 8.1	23.6 $\pm$ 4.1
Model	10	259.7 $\pm$ 14.8	221.1 $\pm$ 17.2	-38.6 $\pm$ 6.8*
Trans	10	254.0 $\pm$ 6.3	258.0 $\pm$ 10.5	4.0 $\pm$ 9.4 Δ

*: 与对照组比较, 模型组给药后体重明显下降($P < 0.05$); Δ : 与模型组比较, 细胞移植组给药后体重增加($P < 0.05$)。

*: Compared with Control group, body weight of rats after administration decreased significantly in Model group($P < 0.05$);

Δ : Compared with Model group, body weight of rats after administration increased in Trans group($P < 0.05$).

2.2 各组大鼠动情周期变化

对照组动情周期稳定在 4-5 天;模型组大鼠于给药后 1 周左右出现动情周期紊乱,动情间期延长,动情周期 8-10 天;细胞

移植组动情周期变化不明显,60 %于给药后 10 天左右出现动情周期略有延长,5-6 天。各期阴道涂片 HE 染色结果(图 1)。

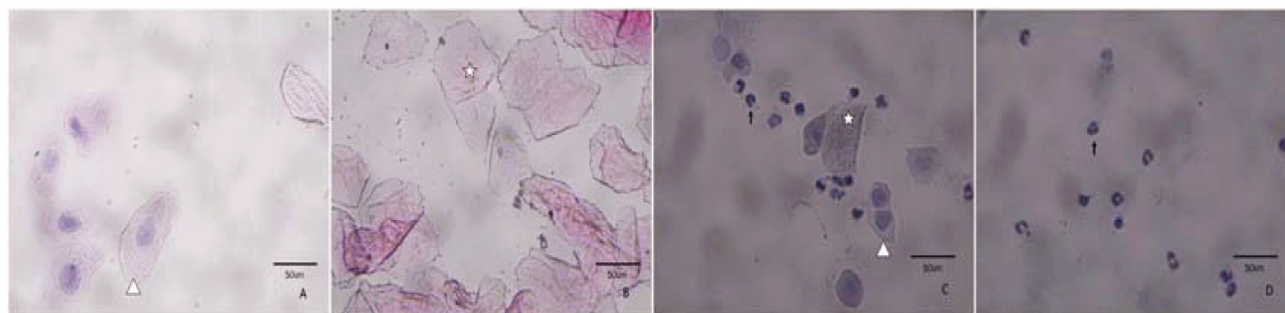


图 1 大鼠各期阴道涂片 HE 染色结果(400×) A:动情前期;B:动情期;C:动情后期;D:动情间期。(△:有核上皮细胞;☆:无核角化细胞;↑:白细胞)
Fig. 1 Results of vaginal smear HE staining (400×) A: proestrus; B: estrus; C: metestrus; D: diestrus. (△: Nucleated epithelial cells; ☆: Keratinocytes; ↑: leukocytes)

2.3 卵巢功能检测结果

2.3.1 各组大鼠卵泡数量比较 (1)与对照组相比,模型组与细胞移植组总卵泡数下降($P < 0.05$),但细胞移植组较模型组明显升高($P < 0.05$);(2)与对照组相比,模型组及细胞移植组小卵泡数有所下降,细胞移植组小卵泡数较模型组升高,但均无

统计学意义($P > 0.05$);(3)与对照组比较,模型组与细胞移植组中大卵泡数下降($P < 0.05$),但细胞移植组较模型组明显升高($P < 0.05$);(4)各组小卵泡及中大卵泡所占比例有明显差异($P < 0.05$);(5)与对照组相比,模型组与细胞移植组卵巢湿重减少($P < 0.05$),但细胞移植组较模型组增加明显($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠单个卵巢卵泡数量及卵巢湿重($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Number of follicles and wet weight of ovary in a single ovary($\bar{x} \pm s$)

Group	Number of rats	Total number of follicles	Numbers and proportion(%) of small follicles	Numbers and proportion(%) of large follicles	Wet weight(mg)
Control	10	1789± 101	991± 83(55± 2 %)	798± 53(45± 2 %)	72± 1
Model	10	1182± 111*	913± 79(77± 2 %*)	269± 41*(23± 2 %*)	36± 4*
Trans	10	1581± 82 *△	973± 45(62± 1 %*△)	608± 41*△(38± 1 %*△)	62± 4*△

注: *:与对照组相比, $P < 0.05$; △:与模型组相比, $P < 0.05$ 。

*: Compared with Control group, $P < 0.05$; △: Compared with Model group, $P < 0.05$.

2.3.2 各组大鼠性激素水平变化 与对照组比较,模型组 E2 明显下降,FSH 及 LH 明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,细胞移

植组 E2 明显升高,FSH 及 LH 明显下降($P < 0.05$),与对照组比较,FSH 已接近正常($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠 E2,FSH,LH 测定结果($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Testing results of E2, FSH, LH

Group	Numbers of rats	E2(pg/mL)	FSH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)
Control	10	93.47± 8.14	4.67± 0.67	6.81± 0.32
Model	10	30.57± 6.85*	6.65± 0.61*	8.97± 0.67 *
Trans	10	82.33± 8.08* △	4.90± 0.21△	7.77± 0.35 * △

注: *:与对照组相比, $P < 0.05$; △:与模型组相比, $P < 0.05$ 。

Note: *: Compared with Control group, $P < 0.05$; △: Compared with Model group, $P < 0.05$.

2.4 卵巢组织形态学

对照组大鼠卵巢石蜡切片 HE 染色可见各级发育阶段的卵泡;模型组大鼠卵巢切片中见各级卵泡数减少,小卵泡及中

大卵泡均减少,闭锁卵泡数增加,间质血管增生,组织纤维化;细胞移植组大鼠卵巢切片中大卵泡较模型组增加,闭锁卵泡减少,间质纤维化不明显(图 2)。

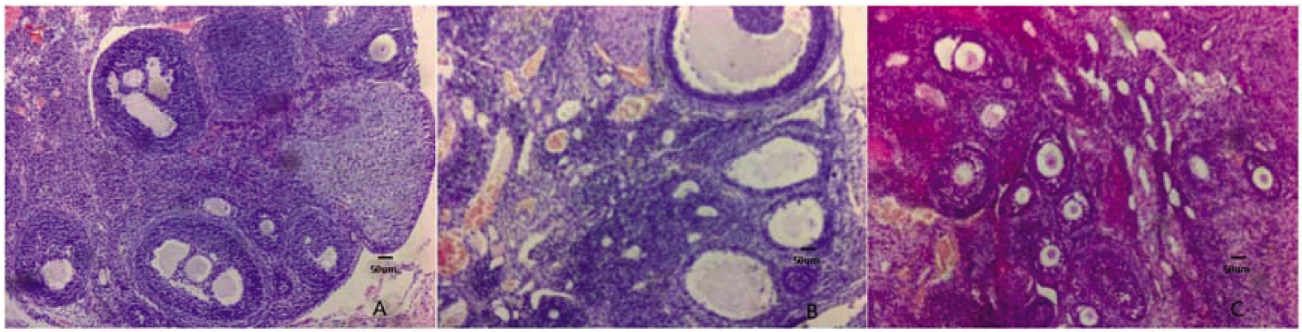


图2 各组大鼠卵巢组织病理学变化(100×)

Fig. 2 Changes of ovarian tissue pathology(100×)

注:A:对照组,B:模型组,C:细胞移植组。

Note: A: Control group; B: Model group; C: Trans group.

2.5 TUNEL 原位细胞凋亡检测

TUNEL 染色显示凋亡细胞细胞核发射强烈的红色荧光。见图3, 凋亡细胞主要为卵巢颗粒细胞。对照组 AI 为 $9.47 \pm 1.79\%$, 模型组 AI 为 $46.65 \pm 6.75\%$, 细胞移植组 AI 为

$18.99 \pm 2.05\%$, 三组比较均有统计学意义($P < 0.05$)。模型组较对照组 AI 明显升高。细胞移植组较模型组 AI 又明显下降, 但未达到正常水平。

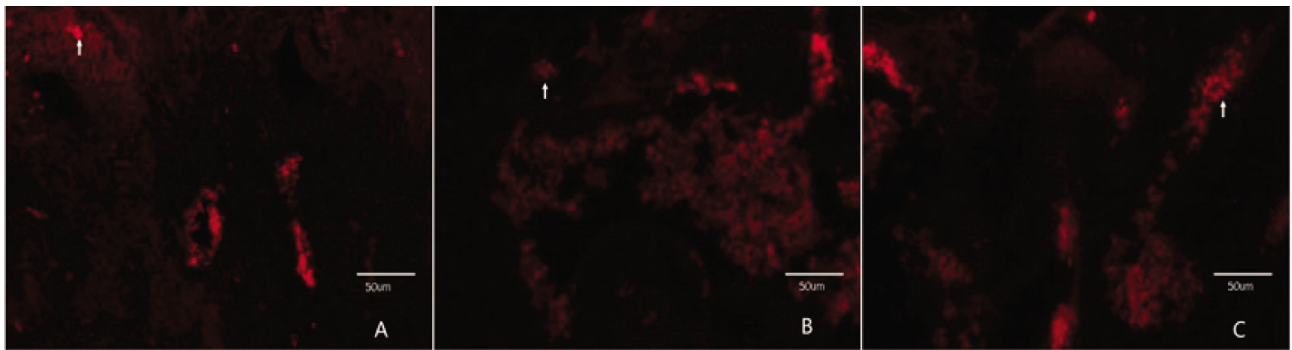


图3 各组大鼠 TUNEL 检测结果(× 400)

Fig. 3 Testing results of AI of ovary tissue with TUNEL(× 400)

注:A:对照组,B:模型组,C:细胞移植组。(↑:凋亡细胞核)。

Note: A: Control group; B: Model group; C: Trans group. (↑: apoptosis nucleus)

3 讨论

环磷酰胺是目前应用广泛的一种烷化剂类抗肿瘤药物,对多种肿瘤治疗有一定疗效,如乳腺癌、恶性胸腺瘤、慢性粒细胞白血病、恶性淋巴瘤等^[11-13]。环磷酰胺在治疗肿瘤的同时存在着显著的生殖毒性^[14,15],对卵巢的损伤主要反映在卵巢储备功能的下降^[16]。本实验以客观的指标证实了 MBSc 移植对化疗引起的卵巢功能损伤有一定的保护作用。

3.1 MBSc 对卵巢功能及病理形态的影响

卵泡数量及性激素能够反映卵巢功能,卵泡数量是反应卵巢功能的直接指标,E2 及促性腺激素是反应卵巢功能的间接指标^[17]。卵巢重量影响着卵泡数量从而也能间接的体现出卵巢功能,大鼠动情周期阴道涂片的变化与性激素水平有关,也是间接反应卵巢功能的指标。本实验中发现模型组卵巢重量及卵泡总数较对照组均明显下降,动情间期延长,E2 下降,FSH 及 LH 升高,证实了环磷酰胺对卵巢功能的损伤。组织病理学的变化发现模型组卵泡闭锁增加,间质血管增生,纤维化。提示卵泡

数的减少是通过卵泡闭锁,组织破坏后纤维化引起的。卵泡计数中主要以中大卵泡数量及其比例的下降为主,提示环磷酰胺对卵泡的主要破坏部位在中大卵泡。这与 David 研究结果相符^[18]。同时与模型组比较,细胞移植组卵巢重量及卵泡数量明显增加,动情周期缩短,E2 增加,FSH 及 LH 下降,FSH 已接近正常,证实了 MBSc 对环磷酰胺引起的卵巢损害有修复作用。病理中可见生长卵泡及窦状卵泡增加,提示 MBSc 促进了卵泡的发育,减少了环磷酰胺对卵泡的破坏。

从实验中我们也发现细胞移植组多数指标并未达到对照组水平,成熟卵泡及黄体增加不明显。考虑其原因可能是移植细胞量较少,不足以对抗修复环磷酰胺引起的卵泡损伤。Ghadami 等研究发现^[19]MBSc 移植能增加卵泡刺激素受体敲除小鼠窦状卵泡数及颗粒细胞 FSHR 的表达,我们的实验发现经 MBSc 移植后中大卵泡增加,这与 Ghadami 的研究结果相符。LEE 等发现^[20]骨髓移植能够营救化疗诱导的卵巢早衰的长期生育力,可见骨髓移植对卵巢早衰排卵是有一定影响的。增加细胞移植量有可能会使卵泡成熟排卵。

3.2 MBSc 对大鼠卵巢细胞凋亡的影响

本实验发现模型组与对照组及细胞移植组比较,卵巢闭锁卵泡增加。卵巢细胞死亡发生卵泡闭锁,是通过细胞凋亡完成的^[2]。通过 TUNEL 原位细胞凋亡检测法检测各组卵巢组织中的细胞凋亡水平,结果表明模型组 AI 明显增加,经移植 MBSc 后 AI 明显下降。证明环磷酰胺对卵巢功能的损伤与增加卵巢组织细胞凋亡率有关,同时 MBSc 通过减少卵巢颗粒细胞凋亡率而在一定程度上保护卵巢功能。

综上所述,MBSc 可以减少卵巢组织细胞 AI, 从而减少环磷酰胺引起的卵巢功能损伤,保护卵巢功能。减少卵巢组织细胞凋亡的具体机制有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Bricaire L, Laroche E, Bourcigaux N, et al. Premature ovarian failures [J]. Presse Medz, 2013, 42(11): 1500-1507
- [2] Desmeules P, Devine PJ. Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries[J]. Toxicol Sci, 2006, 90(2): 500-509
- [3] Kilic S, Pinarli F, Ozogul C, et al. Protection from cyclophosphamide-induced ovarian damage with bone marrow-derived mesenchymal stem cells during puberty [J]. Gynecol Endocrinol, 2014, 30(2): 135-140
- [4] Rezvanfar M, Sadrkhanlou R, Ahmadi A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress [J]. Hum Exp Toxicol, 2008, 27(12): 901-910
- [5] Reed S A, Leahy E R. Growth and Development Symposium: Stem cell therapy in equine tendon injury [J]. J Anim Sci, 2013, 91(1): 59-65
- [6] Salamon A, Toldy E, Nagy L, et al. The role of adult bone marrow derived mesenchymal stem cells in the repair of tissue injuries[J]. Orv Hetil, 2012, 153(46): 1807-1815
- [7] Tawonsawatruk T, Spadaccino A, Murray I R, et al. Growth kinetics of rat mesenchymal stem cells from 3 potential sources: bone marrow, periosteum and adipose tissue [J]. J Med Assoc Thai, 2012, 95(Suppl 10): S189-S197
- [8] Myllamiemi H, Peltokallio P. The effect of high dose cyclophosphamide therapy in the abdominal cavity of the rat: adhesions and their vascular pattern [J]. Ann Chir Gynaecol Fenn, 1974, 63(3): 238-245
- [9] Mclean A C, Valenzuela N, Fai S, et al. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification[J]. J Vis Exp, 2012, (67): e4389
- [10] Ataya K M, Mckanna J A, Weintraub A M, et al. A luteinizing hormone-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian follicular loss in rats [J]. Cancer Res, 1985, 45(8): 3651-3656
- [11] Berardi R, De Lisa M, Pagliaretta S, et al. Thymic neoplasms: An update on the use of chemotherapy and new targeted therapies. A literature review[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(4): 495-506
- [12] Maurer C, Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2013, 138(42): 2153-2166
- [13] Mulligan J M, Hill L A, Deharo S, et al. Identification and validation of an anthracycline/cyclophosphamide-based chemotherapy response assay in breast cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(1): t335
- [14] Chabra A, Shokrzadeh M, Naghshvar F, et al. Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by cyclophosphamide in male mice [J]. Hum Exp Toxicol, 2014, 33(2): 185-195
- [15] Decanter C, Morschhauser F, Pigny P, et al. Anti-Mullerian hormone follow-up in young women treated by chemotherapy for lymphoma: preliminary results[J]. Reprod Biomed Online, 2010, 20(2): 280-285
- [16] Chahvar S T, Al-Shawaf T, Tranquilli A L. Pharmacologic ovarian preservation in young women undergoing chemotherapy[J]. Curr Med Chem, 2014, 21(2): 223-229
- [17] Shoham Z. The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation [J]. Fertil Steril, 2002, 77 (6): 1170-1177
- [18] Davis BJ, Heindel JJ. Ovarian toxicants: multiple mechanisms of action [M]. KORACH K S. Reproductive and developmental toxicology[M]. New York: Dekker, 1998: 373-395
- [19] Ghadami M, El-Demerdash E, Zhang D, et al. Bone marrow transplantation restores follicular maturation and steroid hormones production in a mouse model for primary ovarian failure [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32462
- [20] Lee H J, Selesniemi K, Niikura Y, et al. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(22): 3198-3204
- [21] Basavarajappa M S, Karman B N, Wang W, et al. Methoxychlor induces atresia by altering Bcl2 factors and inducing caspase activity in mouse ovarian antral follicles in vitro[J]. Reprod Toxicol, 2012, 34 (4): 545-551