

坤泰胶囊对 VCD 所致 POI 模型大鼠的疗效探究

周蓓蓓¹, 陈文俊², 谈 勇^{1*}

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046; 2. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

摘要: **目的** 探究坤泰胶囊(黄连、黄芩、阿胶, 等)对去氧乙烯基环乙烯(VCD)所致卵巢功能不全(POI)模型大鼠的疗效。**方法** 75 只 21 日龄离乳大鼠, 随机均分为佐剂对照组, 模型组, 坤泰胶囊低、中、高剂量组。除佐剂对照组腹腔注射芝麻油外, 其余 4 组均给予腹腔注射 VCD 溶液。灌胃给药 45 d。每组选取 8 只持续处于动情间期或持续动情周期紊乱的大鼠, 进行检测大鼠血清促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E₂)、抗苗勒管激素(AMH); 剖腹取出卵巢、子宫称重并进行形态学观察。**结果** 与佐剂对照组相比, 模型组大鼠血清 FSH 明显增高且 AMH、E₂ 显著降低, LH 有所增高; 经坤泰中、高剂量干预后, FSH 水平显著降低, AMH 水平明显增加; 模型组大鼠卵巢湿重较佐剂对照组减轻, 坤泰胶囊干预后, 低剂量组卵巢湿重增加明显; 模型组大鼠各级卵泡及黄体计数均明显减少, 坤泰胶囊干预后, 各级卵泡计数明显增加, 黄体计数有所增加; 光镜下, 模型组子宫内膜变薄, 管壁子宫腺体数量明显减少。经坤泰胶囊干预后, 内膜有所增厚, 腺体数量明显增加。**结论** 坤泰胶囊可以减缓模型大鼠卵巢功能衰减的速度。

关键词: 坤泰胶囊; 卵巢功能不全(POI); 去氧乙烯基环乙烯(VCD)

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)04-0695-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.04.006

Curative effect of Kuntai Capsules on POI rats induced by VCD

ZHOU Bei-bei¹, CHEN Wen-jun², TAN Yong^{1*}

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Zhejiang Provincial Hospital of TCM, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the curative effects of Kuntai Capsules (*Coptidis Rhizoma*, *Scutellariae Radix*, *Asini Corii Colla*, etc.) on rat model for primary ovarian insufficiency (POI) caused by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD). **METHODS** Seventy-five weaned 21-day old rats were divided equally into five groups randomly: control group, model group, low-, medium-, and high-dosage Kuntain group. Except the control group was given sesame oil rats, other four groups were given intraperitoneal injection of VCD solution. According to vaginal smear of rats, eight rats in each group were selected, the levels of FSH (follicle-stimulating hormone), LH (leuteinizing hormone), E₂ (estradiol) and AMH (anti-Mullerian hormone) were measured, and morphological changes of ovary and uterus were observed. **RESULTS** Compared to the control group, FSH level in rats' serum of the model group significantly increased while AMH and E₂ levels significantly decreased, and LH level rose; Kuntai Capsules significantly decreased FSH level while increased AMH level; The wet weight of rats' ovary in the model group was lighter than that in the control group. The ovary weight of Kuntai Capsules low-dosage group was increased; the number of follicles at all levels and corpora lutea of rats in the model group were decreased. After the treatment with Kuntai Capsules, the number of follicles at all levels and corpora lutea were increased; light microscopy manifested decreased uterine glands of the tube wall, reduced glandular cavity. After the treatment with Kun-

收稿日期: 2016-09-29

基金项目: 江苏省科技计划项目临床医学科技专项(BL2013039); 横向课题, 和颜坤泰胶囊对 VCD 所致大鼠卵巢功能损伤动物模型的保护作用研究(2015026)

作者简介: 周蓓蓓(1991—), 女, 硕士生, 研究方向为中医妇科学-不孕症。Tel: 15951853079, E-mail: 15951853079@163.com

* **通信作者:** 谈 勇(1956—), 女, 主任医师, 博士生导师, 教授。E-mail: 1069696137@qq.com

tai Capsules, the number of uterine glands increased and the gland cavity expanded. **CONCLUSION** Kuntai Capsules may slowdown the functional decline rate of ovarian.

KEY WORDS: Kuntai Capsules; primary ovarian insufficiency (POI); 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD)

有文献报道,临床上 50% 确诊为卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 的患者还能间歇性排卵,甚至 5% ~ 10% 的患者在确诊为 POF 后还能自然受孕,说明卵巢功能的过早衰竭不是一蹴而就的,而是一个连续的发展过程,而 POF 相当于其发病的最终阶段^[1-2],现国内外多数专家提议用卵巢功能不全 (primary ovarian insufficiency, POI) 代替 POF。根据 2016 年欧洲人类生殖与胚胎学会指南:POI 是指 40 岁之前出现月经过少/闭经 4 个月以上并伴有促性腺激素水平升高 (促卵泡生成素, follicle stimulant hormone, FSH > 25 IU/L)^[3]。据统计国外 40 岁之前 POI 的发病率约 1%,在中国发病率为 3.8%,其中非特异性 POI 占 80%^[4]。临床上 POI 给患者带来一系列问题,如增加女性心血管疾病、骨质疏松症发病率等^[5-6],并且由 POI 而导致的不孕症发病率逐年增高,并且趋向年轻化。由于 POI 病因错综复杂,现国际上还未有较好的治疗方案,本实验为探究坤泰胶囊对于 POI 模型大鼠卵巢功能是否具有改善作用而开展。

现有对 POI 的研究多局限于动物实验。合适的动物模型为探究疾病病因和治疗提供了良好的实验基础。但现有的造模方法,皆各有优点,同时也各具偏向,例如卵巢切除造模法,虽然能有效地降低卵巢功能,但其属于机械性损伤未能模拟卵巢自然衰竭的过程。工业化学品 VCD 是乙烯基环乙烯 (4-vinylcyclohexene, VCH) 卵巢毒性的主要活性形式,VCD 可以选择性地损伤卵巢储备池中的原始卵泡及初级卵泡,诱导大鼠的卵巢功能逐步衰竭,较好的模拟自然状态下卵巢功能衰竭的进程^[7]。有文献报道^[8-10],连续腹腔注射 80 mg/kg VCD 15 d,待停止注射后 (70 ± 5) d 时,大鼠的卵巢状态接近 POI 的临床特征,因此本实验研究选用 VCD 为造就 POI 大鼠模型的造模药。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 选取 21 日龄离乳雌性 SD 大鼠 75 只,体质量 (50 ± 10) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [许可证号:SCXK (京) 2012-0001]。饲养于南京中医药大学动物实验中心 SPF 环境,自由摄入饮水和食物。适应性饲养 1 周后,采用随机分组,每组 15 只,共分为佐剂对照

组,模型组,坤泰胶囊低、中、坤高剂量组。除佐剂对照组外的 4 组均给予 15 d 腹腔注射质量浓度为 80 mg/kg VCD 溶液 (以芝麻油为溶媒) 2.5 mL/(kg · d),佐剂对照组腹腔注射 15 d 同等剂量芝麻油 2.5 mL/(kg · d)。于 VCD 腹腔注射同时,坤泰胶囊低、中、高剂量组分别灌胃给药至 VCD 停药后 30 d,坤泰胶囊低、中、高剂量组分别为 0.315、0.63、1.26 g/(kg · d),其中坤泰胶囊中剂量组相当于临床等效剂量,给药剂量为 1 mL/100 g。

VCD 干预后,上午 8:00 ~ 11:00 统一称重,同时观察大鼠阴门开始情况,阴门开启后观察大鼠阴道涂片。待饲养至 VCD 停药后 (70 ± 5) d,根据大鼠阴道涂片,选取持续动情周期紊乱或持续处于动情间期的大鼠麻醉麻醉后取材,每组随机选取 8 只。剩余大鼠继续饲养,开展其他相关实验。

1.2 方法

1.2.1 标本制备 大鼠按照 0.35 mL/100 g 计算腹腔注射的 10% 水合氯醛麻醉用量,腹主动脉取血,4 °C 离心后,将血清置于 -80 °C 冰箱保存待测。每组大鼠的卵巢、子宫在解剖显微镜下剥离脂肪组织等,记录湿重,每只大鼠随机选取一侧卵巢和一半的子宫置于 -80 °C 冰箱保存待用,剩余的卵巢和子宫 4% 多聚甲醛固定,常温放置,进行 HE 病理检查。

1.2.2 内分泌指标检测 促卵泡生成素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素 (leuteinizing hormone, LH)、雌二醇 (estradiol, E₂)、抗苗勒管激素 (anti-Mullerian hormone, AMH) 的检测采用酶联免疫吸附 (ELISA) 方法,试剂盒均购于武汉 Elabscience 公司。

1.2.3 相关制剂与仪器 VCD、芝麻油均购自 Sigma 公司;坤泰胶囊 (批号 150805,贵阳新天药业股份有限公司,国药准字 Z20000083);奥林巴斯 CKX41 显微镜;德国赛多利斯 CPA1003P 电子称;PerkinElmer 公司 Enspire™ 多功能酶标仪;德国 Eppendorf Centrifuge 5810R 台式高速冷冻离心机;载玻片;医用棉签等。

1.2.4 大鼠动情周期的观察 大鼠青春期启动标志为阴门开启,排卵标志为动情间期的出现。自

VCD 干预后，每日上午定时观察大鼠阴门开启情况。阴门开启后每日观察大鼠阴道涂片，观察大鼠动情周期的变化。动情周期的判定及阴道涂片的操作方法参考文献 [11]。

1.2.5 统计方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差表示，用方差分析各组间的比较，*t* 检验进行两两对比，以 $\alpha = 0.05$ 的标准， $P < 0.05$ 为差异具有统计学

意义。

2 结果

2.1 大鼠内分泌情况 模型组 FSH、AMH、 E_2 与佐剂对照组相比存在明显差异 ($P < 0.05$)，模型组 LH 与佐剂对照组相比有所升高，但无统计学差异 ($P > 0.05$)。坤泰胶囊干预后，坤泰胶囊低、中、高剂量组 AMH、FSH、LH、 E_2 均有所改变，其中坤泰中剂量组尤为明显 ($P < 0.05$)，见表 1。

表 1 各项性激素对比 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 1 Serum sex hormones levels of rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	FSH/(ng·mL ⁻¹)	LH/(mIU·mL ⁻¹)	E_2 /(pg·mL ⁻¹)	AMH/(ng·mL ⁻¹)
佐剂对照组	0.190 ± 0.026	198.89 ± 50.76	448.82 ± 80.79	9.75 ± 1.23
模型组	0.285 ± 0.079 *	240.03 ± 39.33	382.25 ± 39.12 *	7.55 ± 1.09 *
坤泰低剂量组	0.240 ± 0.043 *	216.81 ± 47.28	400.76 ± 45.12	7.67 ± 1.27 *
坤泰中剂量组	0.220 ± 0.029 #	212.93 ± 42.16	393.83 ± 25.25	10.04 ± 1.26 #
坤泰高剂量组	0.210 ± 0.054 #	205.69 ± 60.11	405.96 ± 81.93	9.61 ± 0.83

注：与佐剂对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

2.2 卵巢、子宫湿重 与佐剂对照组相比，模型组大鼠卵巢湿重明显减轻，经坤泰胶囊干预后，坤泰胶囊低、中、高 3 组的卵巢湿重较模型组有所增加，其中坤泰胶囊低剂量组增重差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组子宫湿重的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 子宫、卵巢湿重对比 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 2 Wet weight of rats' ovary and uterus ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	子宫湿重/g	卵巢湿重/g
佐剂对照组	0.48 ± 0.058	0.14 ± 0.039
模型组	0.43 ± 0.034	0.11 ± 0.017 *
坤泰低剂量组	0.45 ± 0.031	0.15 ± 0.034 #
坤泰中剂量组	0.46 ± 0.100	0.12 ± 0.027
坤泰高剂量组	0.42 ± 0.061	0.13 ± 0.037

注：与佐剂对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

2.3 卵巢组织学变化及卵泡计数

2.3.1 HE 染色光镜检查结果 观察发现，佐剂对照组各级卵泡数量丰富，黄体发育良好、体积大；模型组各级卵泡较佐剂对照组数量大量减少，尤其是原始卵泡、初级卵泡，黄体数量亦减少，体

积明显变小；坤泰低、中、高剂量组与模型组比较，各级卵泡数量有所增加，黄体体积亦增大。

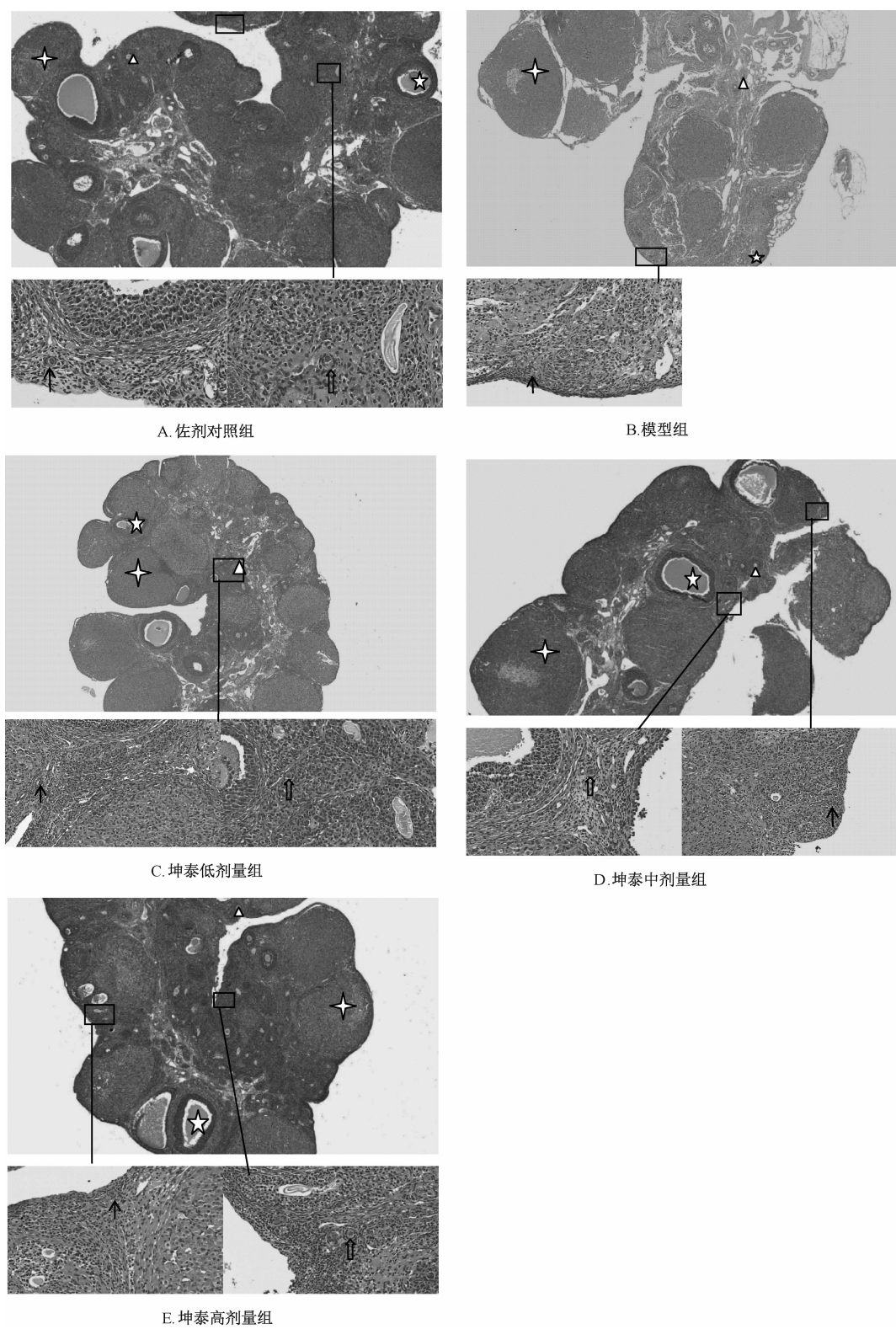
2.3.2 卵巢各级卵泡及黄体计数比较 将每组大鼠卵巢 HE 切片在合适的放大倍数下全卵巢计数原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、窦卵泡和黄体数，每张切片计数 3 次，取平均值。参考标准：原始卵泡，有初级卵母细胞及其周围的单层扁平颗粒细胞组成；初级卵泡，有初级卵母细胞及其周围的单层立方形颗粒细胞组成；次级卵泡，卵母细胞周围有多层颗粒细胞围成；窦卵泡，含有窦腔结构的卵泡。为避免重复计数，原始卵泡和初级卵泡以卵母细胞核为标记物计数，次级卵泡和窦卵泡以卵母细胞核仁为标记物计数。模型组各级卵泡及黄体数量与佐剂对照组相比明显减少 ($P < 0.05$)，经坤泰胶囊干预后，坤泰胶囊低剂量组较模型组初级卵泡数有所增加 ($P < 0.05$)；坤泰胶囊中、高剂量组与模型组相比均发现原始卵泡、初级卵泡数量明显增加 ($P < 0.05$)。见表 3，HE 染色光镜检查结果见图 1。

表 3 各级卵泡及黄体计数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 3 Number of follicles at all levels and corpora lutea of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	原始卵泡	初级卵泡	次级卵泡	窦卵泡	黄体
佐剂对照组	4.17 ± 0.94	3.75 ± 0.75	5.00 ± 0.85	6.50 ± 2.54	12.00 ± 2.98
模型组	1.00 ± 0.95 *	1.50 ± 0.65 *	3.58 ± 0.90 *	4.30 ± 1.43 *	6.85 ± 1.94 *
坤泰低剂量组	1.36 ± 0.92 *	2.27 ± 0.90 *#	3.18 ± 1.32 *	2.73 ± 1.42 **	11.81 ± 1.25 #
坤泰中剂量组	2.83 ± 1.46 **	2.58 ± 1.16 **	3.00 ± 1.65 *	3.25 ± 1.21 *	8.41 ± 4.20 *
坤泰高剂量组	3.08 ± 1.16 **	3.50 ± 0.90 #	3.66 ± 1.00 *	3.75 ± 1.76 *	11.33 ± 4.83 #

注：与佐剂对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$



注：✦为黄体；☆为成熟卵泡；△为次级卵泡；⇅为初级卵泡；↑为原始卵泡

图 1 卵巢光镜下表现 (HE, ×200, 放大小图 ×2 000)

Fig. 1 Morphology of the ovary in different groups of rats observed under the light microscope (HE, ×200, enlarged, ×2 000)

2.4 子宫的形态学改变 内膜、基层以及外模构 成了大鼠子宫，外观各组未见明显差异。HE 染色

光镜检查佐剂对照组子宫可见内膜上皮为单层柱状上皮,较厚;固有层有丰富的基质细胞、腺体。与佐剂对照组相比,模型组内膜变薄,腺体数量减少;坤泰胶囊低剂量组内膜厚度与模型组接近,腺体数量较模型组有所增多;坤泰胶囊中剂量组内膜厚度较低剂量组相比有所增厚,腺体数量丰富;坤泰胶囊高剂量组内膜厚度与佐剂对照组接近,腺体数量丰富。见图 2。

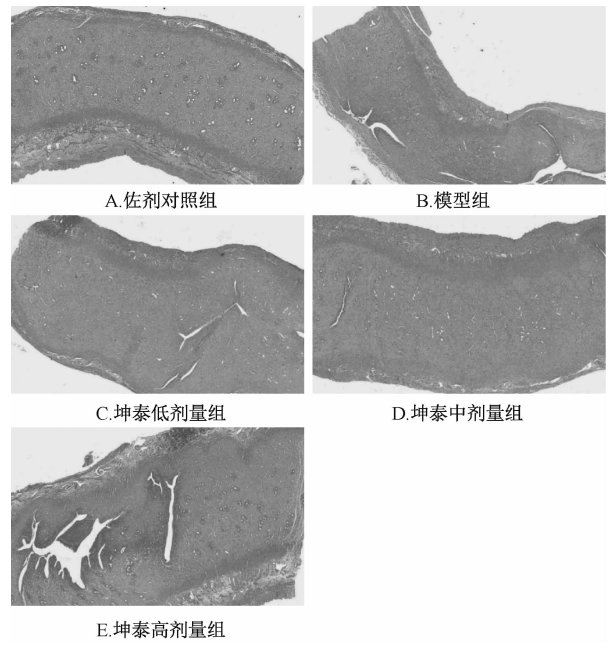


图 2 子宫光镜下表现 (HE, ×200)

Fig. 2 Morphology of the uterus in different groups of rats observed under the light microscope (HE, ×200)

3 讨论

POI 是一种多因素导致的高特异质疾病,与现代生活方式、环境、情志等关系密切,其致病因素复杂,其主要包括遗传因素、免疫因素、酶缺陷、外源性因素(如盆腔手术、放化疗、流行性腮腺炎、长期服用雷公藤等)及无明显原因的特发性 POI,其中特发性 POI 占多数。POI 的发病机制目前尚不明确,存在多种学说,但是卵巢储备池中卵泡的过度耗竭与 POI 之间的关系得到很多专家的共识。

现已有大量实验证明 VCD 能成功建立卵巢功能衰竭的模型,实验方法简便,建模成功率高,并且 VCD 选择性破坏原始卵泡和初级卵泡,最终引起次级卵泡及窦卵泡的减少至消亡。本实验通过各项检测显示,通过 VCD 造成 POI 的大鼠模型,其

血清 AMH 明显降低,AMH 主要是由窦前卵泡的颗粒细胞产生,AMH 是评估卵巢功能很敏感的一项指标,甚至优于 FSH、E₂^[12];同时模型组各级卵泡计数较佐剂对照组明显减少,这些检测结果与 POI 临床特征较为符合,提示我们 VCD 所致的卵巢功能早衰过程类似于女性生理性的卵巢早衰过程,这一实验条件有助于我们更加贴切地观察到雌性大鼠卵巢功能自然衰竭的进程。

POI 其发病因素错综复杂,现代医疗水平治疗此病还未有较好的疗效。西医治疗 POI 是根据患者个体情况制定方案的,主要由以下几个方面:雌孕激素补充治疗,促排卵治疗,赠卵人工授精、胚胎移植,免疫抑制剂治疗等。中医并没有此病名,根据中医理论,多数学者认为 POI 的主要病机是由于肾虚,总体上遵循补肾为治疗原则;国医大师夏桂成教授认为^[13]单纯补肾,对于 POI 虽有一定的效果,但尚不能令人满意。他认为在当今社会心肾不交是 POI 的主要发病机制,提出“交济心肾,以调心为主”是治疗 POI 的主要治法。坤泰胶囊化裁于张仲景《伤寒杂病论》中的黄连阿胶汤,由黄连、黄芩、阿胶、熟地、芍药、茯苓组成,具有滋阴养血、清虚热、安神除烦的功效。现代药理研究表明^[14-15]坤泰胶囊具有植物雌激素样作用,可以改善绝经后女性激素分泌紊乱。另有实验提示^[16]坤泰胶囊有效成分可促进卵泡发育,恢复卵巢分泌激素;改善卵巢血供,延长卵巢的生命力。

故本实验在前期实验研究的条件下观察坤泰胶囊对 POI 模型大鼠的卵巢功能是否具有改善卵巢功能的作用,并且帮助我们发现那些在卵巢生殖寿命中起到重要调控作用的因子。对比各组间卵巢湿重显示,模型组与佐剂对照组存在明显差异,经坤泰胶囊干预后,上述情况得到改善;各组子宫湿重差异无统计学意义,可能与 VCD 的靶目标是卵巢有关;通过卵巢形态学研究发现,坤泰胶囊低、中、高剂量组与模型组比较,原始卵泡、初级卵泡的计数均存在不同程度的增加;且发现坤泰胶囊可以有效调节 POI 模型大鼠 FSH、AMH 水平。由于卵巢组织学观察并未见炎症反应及坏死组织,推测卵巢功能早衰的机制是通过凋亡机制,现国外已开展此项探究,根据已有实验数据学者们提出假设^[17-18]:卵巢生理性的早衰主要通过 Bcl 家族凋亡机制和 KIT/KITL 信号通路 2 种方式,但想证实这两点还需要更多的实验数据。生理性的 POI 通过过多募集卵巢中的原始卵泡和初级卵泡,过度耗竭卵巢储备

池中的储备, 最终使得卵巢功能过早衰竭, 而坤泰胶囊可能通过抑制这种作用对卵巢起到一定的保护和改善作用。但坤泰胶囊是通过何种机制起作用的, 还需要进一步的机制研究探讨。总之, 坤泰胶囊可以减缓模型大鼠卵巢功能衰减的速度, 对雌性大鼠卵巢起到一定的保护作用, 可以调节改善大鼠卵巢内分泌功能。

参考文献:

[1] 吴伍香, 蔡连香, 薛赛琴. 原发性卵巢功能不全中西医结合研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010 (10): 1113-1117.

[2] Welt C K. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure[J]. *Clin Endocrinol*, 2008, 68 (4): 499-509.

[3] 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.

[4] Daan N M, Hoek A, Corpeleijn E, *et al*. Reproductive characteristics of women diagnosed with premature ovarian insufficiency[J]. *Reprod Biomed Online*, 2016, 32(2): 225-232.

[5] Lukefahr A L, Frye J B, Wright L E, *et al*. Decreased bone mineral density in rats rendered follicle-deplete by an ovotoxic chemical correlates with changes in follicle-stimulating hormone and inhibin A [J]. *Calcif Tissue Int*, 2012, 90 (3): 239-249.

[6] Roeters Van Lennep J E, Heida K Y, Bots M L, *et al*. Cardiovascular disease risk in women with premature ovarian insufficiency: A systematic review and meta-analysis[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2016, 23(2): 178-186.

[7] Roosa K A, Mukai M, Place N J. 4-Vinylcyclohexene diepoxide reduces fertility in female Siberian hamsters when treated

during their reproductively active and quiescent states[J]. *Reprod Toxicol*, 2015, 51: 40-46.

[8] Reis F, Pestana-Oliveira N, Leite C M, *et al*. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2014, 49: 130-140.

[9] Kappeler C J, Hoyer P B. 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity [J]. *Sys Biol Reprod Med*, 2012, 58(1): 57-62.

[10] 李园园, 赵淑琴, 邓晓惠, 等. 环境化学物质 VCD 致卵巢功能早衰动物模型的构建[J]. 现代妇产科进展, 2010, 19 (5): 374-376.

[11] Kang X, Jia L, Shen X. Manifestation of hyperandrogenism in the continuous light exposure-induced PCOS rat model[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 943694.

[12] 陈文俊, 李慧芳, 周蓓蓓, 等. 卵巢储备功能低下评估及治疗方法研究进展[J]. 实用医学杂志, 2016, 32 (1): 19-22.

[13] 张 岩, 谈 勇, 夏桂成. 夏桂成调心补肾治疗卵巢早衰经验[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(5): 934-936.

[14] 黄爱芳. 坤泰胶囊联合克龄蒙对卵巢早衰的疗效及相关性激素的影响[J]. 中医药导报, 2014, 20(15): 73-74.

[15] 段燕康, 李 芳, 李进东, 等. 坤泰胶囊对更年期雌鼠激素水平及围绝经期综合征的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(6): 432-435.

[16] 杨 蔚. 坤泰胶囊治疗妇科疾病临床应用研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 453-458.

[17] Keating A F, Fernandez S M, Mark-Kappeler C J, *et al*. Inhibition of PIK3 signaling pathway members by the ovotoxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats[J]. *Biol Reprod*, 2011, 84 (4): 743-751.

[18] Zhu L, Li J, Xing N, *et al*. American ginseng regulates gene expression to protect against premature ovarian failure in rats [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 767124.