

多柔比星对体外培养小鼠腔前卵泡发育的影响

张 婷/李 雷/王忠辉/

严建燕/潘 琦/刘向云/孙祖越*

(上海市计划生育科学研究所药理毒理室, 中国
生育调节药物毒理检测中心, 上海 200032)

Effect of doxorubicin on the development of cultured preantral follicles in mice

ZHANG Ting, LI Lei, WANG Zhong-hui,

YAN Jian-yan, PAN Qi, LIU Xiang-yun, SUN Zu-yue*

(Department of Pharmacology and Toxicology, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, National Evaluation Centre for the Toxicology of Fertility Regulating Drugs, Shanghai 200032, China)

【摘要】目的: 利用雌性ICR小鼠腔前卵泡体外培养方法观察多柔比星对卵泡发育的影响, 对多柔比星卵巢毒性机制进行初步探讨。**方法:** 取12~14日龄的雌性ICR小鼠卵巢的腔前卵泡进行原代培养, 在培养的第2、6和11天, 分别用不同浓度的多柔比星(0.4、0.8、1.6和3.2 $\mu\text{g/mL}$)染毒24 h后继续培养。通过测量卵泡的大小、存活率和卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte cell complexes, COCs)的排出率来判定多柔比星对腔前卵泡发育的影响。**结果:** 在实验所设置的剂量范围内, 与对照组比较, 多柔比星在1.6和3.2 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下能明显抑制雌性ICR小鼠卵巢腔前卵泡的发育($P<0.05$), 降低卵泡的存活率($P<0.05$), 并抑制COCs的排出($P<0.05$), 且呈一定的剂量效应关系。**结论:** 多柔比星可抑制腔前卵泡的发育, 降低卵泡的存活率, 抑制COCs的排出, 从而引起卵巢毒性, 产生卵巢功能障碍。

【关键词】 多柔比星; 腔前卵泡; 生殖毒性; 卵丘-卵母细胞复合体

中图分类号: R394.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2013)05-0360-06 doi:10.3969/j.issn.1004-616x.2013.05.008

【ABSTRACT】OBJECTIVE: To study the effect of doxorubicin on the development of cultured preantral follicles in female ICR mice and explore the preliminary mechanism of ovarian toxicity. **METHODS:** Cultured ovarian preantral follicles taken from day 12-14 female ICR mice were treated for 24 h with various concentrations of doxorubicin (0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 $\mu\text{g/mL}$) on cultured day 2, 6 or 11. Following the treatment, follicles were cultured to the endpoint. Follicle diameter measurement, follicle viability and cumulus-oocyte cell complexes (COCs) ovulation rate were used to confirm the effect on preantral follicle development. **RESULTS:** Compared to the control group, doxorubicin at the concentrations of 1.6 and 3.2 $\mu\text{g/mL}$ could inhibit ovarian preantral follicle development ($P<0.05$), decrease the viability ($P<0.05$) and inhibit COCs ovulation ($P<0.05$) in a concentration-dependent manner. **CONCLUSION:** Doxorubicin could significantly inhibit the development of ovarian preantral follicles, decrease the viability and inhibit COCs ovulation, which could induce ovarian toxicity and dysfunction.

【KEY WORDS】 doxorubicin; preantral follicles; reproductive toxicity; cumulus-oocyte cell complexes

多柔比星(doxorubicin), 又名阿霉素(adriamycin), 是一种抗肿瘤抗生素, 可抑制RNA和DNA的合成, 抗癌谱较广, 对多种肿瘤均有作用, 属周期非特异性药物。主要适用于急性白血病, 此外还有恶性淋巴瘤、

乳腺癌、肉瘤、肺癌、膀胱癌等。主要的毒性反应有白细胞和血小板减少, 以及心脏毒性。近年来, 由于妇科恶性肿瘤有发病年轻化的趋势, 特别是乳腺癌患者使用多柔比星后造成生殖系统损伤, 包括卵巢毒

收稿日期: 2013-05-16; 修订日期: 2013-06-26

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项“十二五”计划(2011ZX09301-005)

作者简介: 张 婷(1974-), 女, 湖北省武汉市人, 博士, 研究方向: 生殖毒性。E-mail: fuzzyting@163.com

*Correspondence to: SUN Zu-yue, E-mail: Sunzy64@163.com

性, 子宫内膜毒性, 引起停经、闭经、无排卵、生育功能丧失等^[1-3]。在动物实验中发现多柔比星能引起动物卵巢质量降低, 导致卵巢内多数卵母细胞和颗粒细胞发生变性、坏死^[4]。有研究发现, 多柔比星引起的卵巢毒性是依赖于细胞和卵泡损伤引起的, 能引起卵母细胞的DNA双链断裂, 但其具体的机制并不十分清楚^[5]。小鼠腔前卵泡培养技术是近些年来发展的将早期腔前卵泡不成熟卵母细胞(GV期或GV前期)在体外发育到可正常受精的成熟卵母细胞(MII)的方法。由于该方法能对卵巢的主要功能即卵泡发育和卵子发生进行动态观察, 可在卵泡不同发育阶段对卵泡每一组分进行分析, 因此受到生殖生物学和生殖毒理学界的关注。本实验采用多柔比星作用于不同培养阶段的卵泡, 观察其对卵泡的发育情况、存活率及卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte cell complexes, COCs)排出率的影响来初步探寻可能的卵巢毒性作用机制, 为多柔比星在临床上的使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

性成熟雌雄ICR小鼠各6只, 体质量(25±2)g, SPF级, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 动物合格证号2008-0016。随机分配后雌雄配对单笼饲养于上海计划生育研究所清洁级小动物房。合笼出生后(post-natal day, PND)的仔鼠当天记为PND 0天, 青春期前PND 12~PND 14 F1代雌性仔鼠用于分离腔前卵泡进行培养。

1.2 试剂

人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG), 购自宁波市激素制品有限公司; 胎牛血清(fatal bovine serum, FBS), 购自Gibco公司; 促卵泡生成素(follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、M2操作液、 α -MEM、M16培养液、矿物油(mineral oil), 均购自美国Sigma公司; 多柔比星, 购自上海金穗生物科技有限公司; DAPI染料, 购自瑞士Roche公司。

1.3 方法

1.3.1 小鼠腔前卵泡体外培养方法的建立 12~14日龄雌性仔鼠颈椎脱臼处死, 全身消毒后取卵巢。用注射器针头在解剖镜下分离卵巢, 去掉多余脂肪组织和结缔组织, 把卵巢转移到M2操作液(含100 U/mL青霉素, 100 μ g/mL链霉素, 20% FBS)中, 体视显微镜下用针头分离腔前卵泡。收集有2~3层颗粒细胞包裹的腔前卵泡(直径110~130 μ m)。操作液中洗涤3次后,

随机放入40 μ L培养液滴(含 α -MEM, 100 U/mL青霉素, 100 μ g/mL链霉素, 5% FBS, 1% ITS, 100 mU/mL FSH, 10 mU/mL LH)中, 培养液滴上覆盖矿物油并在培养箱中平衡12 h以上。液滴放置在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱, 饱和湿度培养, 培养当天记为D0。隔日半定量换液, 倒置显微镜下观察生长状况, 测量直径。培养12 d后, 加入M16培养液(含1.5 U/mL rHCG, 5 ng/mL rEGF)诱导排卵, 16~24 h后观察卵泡的排卵并收集COCs。

1.3.2 多柔比星对卵泡发育的影响 培养方法建立后, 采用该方法检测多柔比星对卵泡发育的影响。实验设多柔比星4个浓度组(终浓度分别为0.4、0.8、1.6和3.2 μ g/mL)和培养液对照组。多柔比星先用生理盐水充分溶解至澄清后, 一次性灭菌滤器过滤后配制为1 mg/mL的母液, 加药时用卵泡培养液稀释为所需的终浓度。单次实验每组25~35个卵泡, 实验重复3次。分别于卵泡不同发育阶段(D2, 腔前卵泡阶段; D6, 有腔卵泡阶段)暴露多柔比星24 h后, 卵泡连续在体外培养至实验终点(D12), 隔天换1/2培养液, 观察卵泡的发育形态, 测量卵泡的直径并计算存活率。不同发育阶段多柔比星染毒分为不同实验批次进行, 同批次中将重复3次的实验数据进行累积统计处理。

1.3.3 多柔比星对COCs排出率的影响 采用上述多柔比星的培养终浓度, 分别于卵泡不同发育阶段(D2, 腔前卵泡阶段; D6, 有腔卵泡阶段; D11, 排卵前卵泡阶段)暴露多柔比星24 h后, 卵泡继续在体外连续培养至实验终点(D12)促排卵, 观察多柔比星对诱导排卵后COCs排出率的影响。

1.3.4 卵泡毒性的形态学评价标准 卵泡出现毒性的形态学标准为卵泡漂浮不能良好贴壁, 突出培养皿底部, 基底膜模糊、缺损或消失; 卵泡轮廓不规则或卵泡内出现黑色坏死区; 颗粒细胞松散或游离到卵泡外, 卵母细胞逸出卵泡、变形、萎缩或崩解等退化卵泡表现, 出现毒性的卵泡在测算卵泡直径和存活率时不计入内。除采用常规Motic倒置光镜观察测量外, 出现明显毒性的卵泡用甲醇固定后, 于4 $^{\circ}$ C采用0.2 μ g/mL DAPI染色30 min, 随后用PBS洗3次后避光在Nikon荧光显微镜以最大吸收/最大发射为358 nm/461 nm下观察拍照。

1.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 18.0软件进行数据处理, 多组样本的两两比较采用One-Way ANOVA分析, 相关性分析采用Spearman's等级相关检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。



2 结果

2.1 小鼠腔前卵泡体外培养方法的建立

腔前卵泡在培养的第2天,开始贴壁生长;第4天,颗粒细胞数目增多,卵泡直径明显增大,随后突破基底膜生长;第7天以后多数失去立体结构呈摊大饼式生长,并出现半透明的窦腔样结构。培养第8天,一些卵泡开始形成充满液体腔系,在显微镜下可见颗粒细胞区的透明区,颗粒细胞分化成卵丘颗粒细胞层包绕卵母细胞和膜颗粒细胞层;在接下来的4天培养中,卵泡直径发生显著变化,腔样间隙增大,内可见COCs。培养第12天诱导排卵16~24 h后,可以观

察到伴随卵丘细胞扩展的黏液化,COCs排出,悬浮在培养基中,卵丘细胞松散,吹洗掉卵丘细胞后见到成熟卵母细胞,卵母细胞分裂生发泡破裂,可见有极体的排出。腔前卵泡的发育见图1。培养前分离的腔前卵泡的直径为 $(118.0 \pm 15.5) \mu\text{m}$,随着培养时间的延长而不断增加,第2天平均直径为 $(184.9 \pm 54.7) \mu\text{m}$,第4天平均直径为 $(289.2 \pm 44.8) \mu\text{m}$,第6天平均直径为 $(316.1 \pm 92.6) \mu\text{m}$,第8天平均直径为 $(386.1 \pm 120.2) \mu\text{m}$,第12天平均直径为 $(440.7 \pm 116.6) \mu\text{m}$,卵泡发育情况见图2。6只仔鼠共分离出312个卵泡,培养12天的存活率为85.3%,COCs的排出率为41.7%。

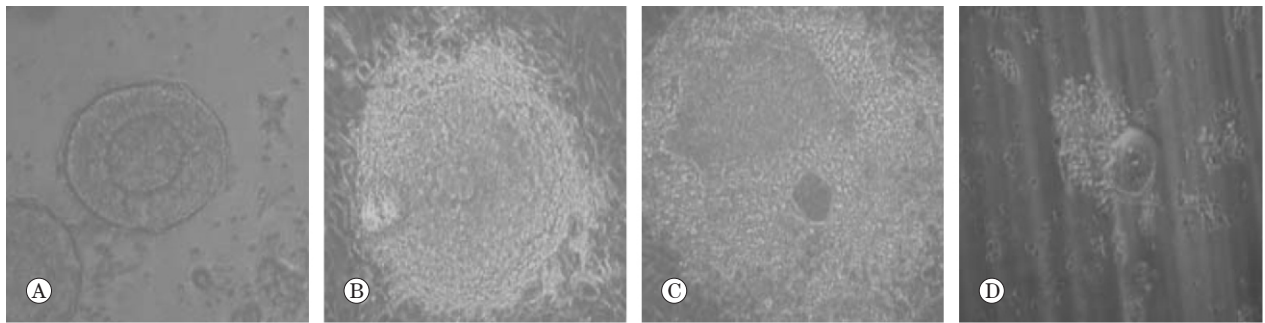


图1 体外培养腔前卵泡形态学变化($\times 200$)。A: 培养前分离的腔前卵泡; B: 培养4 d的卵泡; C: 培养8 d的成腔卵泡; D: 排出卵丘-卵母细胞复合体。

Figure 1 Photomicrographs of cultured preantral follicle development *in vitro* ($\times 200$). A: separated mouse ovarian preantral follicle; B: cultured follicles for 4 days; C: cultured follicles for 8 days; D: cumulus-oocyte cell complexes ovulation.

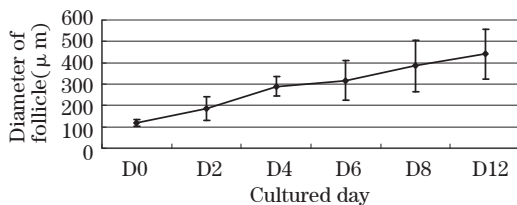


图2 雌性ICR小鼠卵巢腔前卵泡体外培养曲线。

Figure 2 Growth curve of cultured preantral follicle in female ICR mice.

2.2 多柔比星对卵泡发育和存活率的影响

在腔前卵泡培养的第2天和第6天分别加入不同浓度的多柔比星可以观察到随着剂量增加存活的卵泡生长缓慢。在 $0.4 \mu\text{g/mL}$ 剂量时,卵泡的发育在第4天出现迟缓,闭锁卵泡数目开始增加,在 $0.8 \mu\text{g/mL}$ 剂量时,卵泡的发育在第4天更为缓慢,闭锁退化卵泡不断增加,在 1.6 和 $3.2 \mu\text{g/mL}$ 剂量时,出现较为明显的卵泡毒性,随着培养时间的延长,卵泡发育非常缓慢,与对照组相比,卵泡大小在第8天和第12天显著偏小($P < 0.05$),存活数目下降且呈剂量相关性。在 1.6 和 $3.2 \mu\text{g/mL}$ 剂量时,存活率与对照组相比在第8天和第12天显著下降($P < 0.05$)。卵泡毒性时,会出现明显

的形态学异常,贴壁的膜细胞出现明显的细胞毒性,细胞呈圆形不能良好贴壁,基底膜模糊、缺损或消失,卵泡内出现黑色坏死区。颗粒细胞松散或游离到卵泡外,卵泡轮廓也不规则,卵母细胞逸出卵泡、萎缩或坏死形成退化闭锁卵泡,如图3所示。第2天和第6天分别加入不同浓度的多柔比星卵泡直径变化、存活数目和存活率的改变分别见表1和表2,图4和图5。

2.3 多柔比星对COCs排出率的影响

在腔前卵泡培养的第2天、第6天和第11天加入不同浓度的多柔比星可以观察到随着剂量的增加,超排卵后 1.6 和 $3.2 \mu\text{g/mL}$ 剂量组均对COCs的排出率有显著地抑制的作用,以第6天加入多柔比星抑制促排卵作用最强。见表3。

3 讨论

腔前卵泡当其所处内外环境中各种调节因子浓度达到正常时,卵泡开始迅速生长发育,呈现“卵泡波”的特征。发育过程主要经历原始卵泡的募集,腔前卵泡的发育,有腔卵泡的选择和生长,排卵或闭锁等一系列连续的过程。由于腔前卵泡在发育过程中对

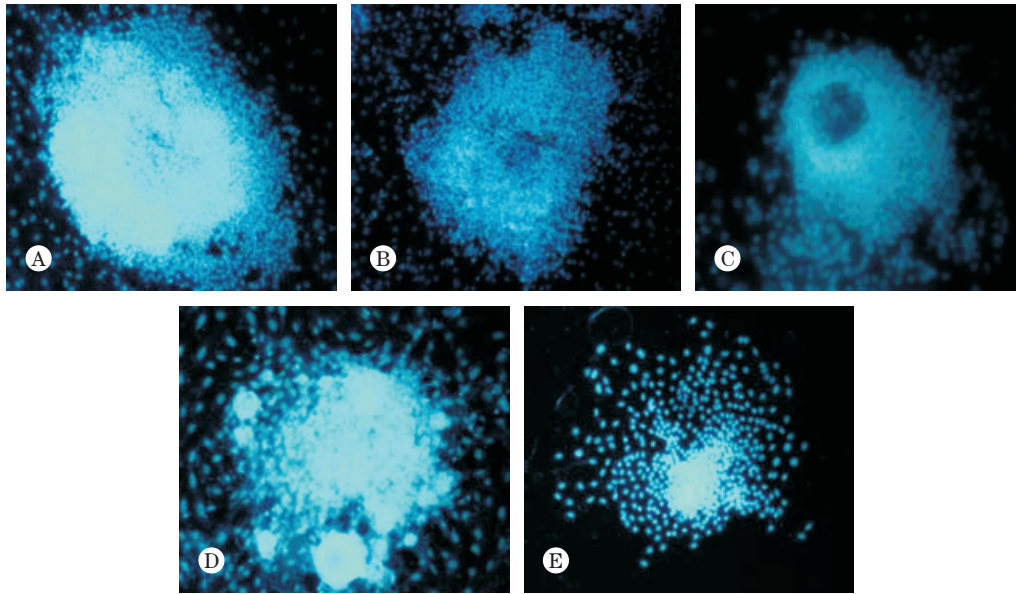


图 3 多柔比星暴露后出现的卵泡毒性形态 (DAPI 染色, $\times 100$)。A: 正常发育的卵泡; B: 基底膜模糊、缺损或消失; C: 卵母细胞退化闭锁; D: 卵母细胞逸出卵泡; E: 卵泡轮廓消失, 萎缩形成退化闭锁卵泡。
Figure 3 Photomicrographs of follicle toxicity following doxorubicin exposure (DAPI staining, $\times 100$). A: normal developed follicle; B: basement membrane was vague, losing or disappearing; C: oocyte degeneration and atresia; D: oocyte escaped from follicle; E: follicle shape was losing, shrinking and atresia.

表 1 腔前卵泡体外培养第2天进行多柔比星染毒后的卵泡直径变化 ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Table 1 Diameter of cultured preantral follicle following exposure of doxorubicin on day 2 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Diameter (μm)					
	D0	D2	D4	D6	D8	D12
Control	120.0 \pm 6.2	187.9 \pm 21.6	297.7 \pm 32.0	342.6 \pm 46.8	400.6 \pm 60.2	463.4 \pm 49.3
Doxo 0.4 $\mu\text{g/mL}$	119.0 \pm 5.5	174.2 \pm 29.6	242.0 \pm 45.9	297.0 \pm 30.3	354.2 \pm 40.0	408.0 \pm 45.0
0.8 $\mu\text{g/mL}$	120.5 \pm 4.9	188.2 \pm 23.1	201.4 \pm 18.0	226.2 \pm 18.7	294.2 \pm 34.0	333.1 \pm 24.2
1.6 $\mu\text{g/mL}$	119.4 \pm 5.3	182.0 \pm 31.7	191.9 \pm 22.9	210.2 \pm 22.8	243.3 \pm 31.5*	270.9 \pm 24.0*
3.2 $\mu\text{g/mL}$	119.5 \pm 5.5	186.6 \pm 33.1	183.9 \pm 36.9	194.4 \pm 17.3	211.3 \pm 14.5*	229.0 \pm 10.1*

Doxo: doxorubicin. Compared with control group, * $P < 0.05$.

表 2 腔前卵泡体外培养第6天进行多柔比星染毒后的卵泡直径变化 ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Table 2 Diameter of cultured preantral follicle following exposure of doxorubicin on day 6 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Diameter (μm)					
	D0	D2	D4	D6	D8	D12
Control	115.9 \pm 7.3	180.1 \pm 23.9	261.7 \pm 27.6	314.6 \pm 23.9	369.5 \pm 29.0	440.0 \pm 38.8
Doxo 0.4 $\mu\text{g/mL}$	116.2 \pm 6.0	169.9 \pm 32.4	241.1 \pm 42.6	309.4 \pm 46.3	311.1 \pm 22.3	336.8 \pm 30.7
0.8 $\mu\text{g/mL}$	117.8 \pm 5.2	173.4 \pm 21.9	243.8 \pm 31.5	295.4 \pm 30.8	290.2 \pm 20.0	293.7 \pm 14.9
1.6 $\mu\text{g/mL}$	116.4 \pm 5.8	169.3 \pm 18.0	252.6 \pm 28.2	302.1 \pm 27.0	285.3 \pm 11.0*	264.0 \pm 13.8*
3.2 $\mu\text{g/mL}$	118.2 \pm 5.4	181.6 \pm 20.0	249.9 \pm 33.5	303.7 \pm 36.2	255.9 \pm 20.7*	255.7 \pm 17.2*

Doxo: doxorubicin. Compared with control group, * $P < 0.05$.

表 3 腔前卵泡体外培养第2、6和11天进行多柔比星染毒后的COCs排出率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Table 3 COCs discharge rate of cultured preantral follicle following exposure of doxorubicin on day 2, day 6 and day 11 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	D2		D6		D11	
	Viable follicle on D12	COCs discharge rate (%)	Viable follicle on D12	COCs discharge rate (%)	Viable follicle on D12	COCs discharge rate (%)
Control	102	40.1 \pm 3.3	93	45.0 \pm 3.2	52	43.9 \pm 3.7
Doxo 0.4 $\mu\text{g/mL}$	65	33.6 \pm 4.8	52	13.2 \pm 6.0	49	28.6 \pm 3.2
0.8 $\mu\text{g/mL}$	45	17.7 \pm 2.3	35	11.8 \pm 5.7	46	15.1 \pm 3.1
1.6 $\mu\text{g/mL}$	24	3.7 \pm 6.4*	20	0.0 \pm 0.0*	47	2.0 \pm 3.4*
3.2 $\mu\text{g/mL}$	9	0.0 \pm 0.0*	6	0.0 \pm 0.0*	50	0.0 \pm 0.0*

Doxo: doxorubicin. Compared with control group, * $P < 0.05$.



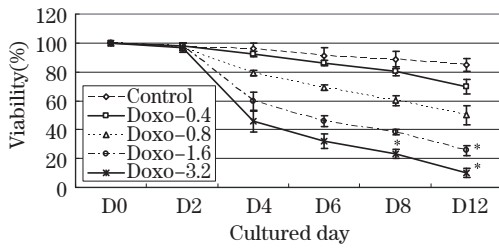


图 4 腔前卵泡体外培养第2天进行多柔比星染毒后的卵泡存活率 ($n=3, \bar{x} \pm s$). Doxo: 多柔比星. 与对照组比较, $*P < 0.05$.

Figure 4 Viability of cultured preantral follicle following exposure of doxorubicin on day 2 ($n=3, \bar{x} \pm s$). Doxo: doxorubicin. Compared with control, $*P < 0.05$.

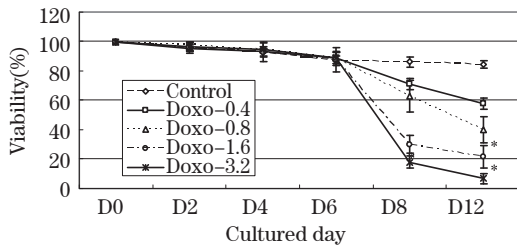


图 5 腔前卵泡体外培养第6天进行多柔比星染毒后的卵泡存活率 ($n=3, \bar{x} \pm s$). Doxo: doxorubicin. Compared with control, $*P < 0.05$.

Figure 5 Viability of cultured preantral follicle following exposure of doxorubicin on day 6 ($n=3, \bar{x} \pm s$). Doxo: doxorubicin. Compared with control, $*P < 0.05$.

各种物质刺激反应敏感, 2004年Sun F等^[6]率先将此体系应用到检测各种物理和化学因子的生殖毒性方面, 国内的科研工作者随后也进行了积极的探索与应用, 并确定应用该检测方法的灵敏性和可靠性^[7-8]。通过前期的实验发现由于采用二维体外培养体系, 一些在显微镜下未观察到明显腔隙的卵泡也有COCs的排出, 因此将COCs排出作为卵泡发育力特征指标相对客观, 且实验中收集COCs比较简便。由于采用小鼠腔前卵泡IVG方法中卵母细胞发育到生发泡破裂期(GVBD)的比例较高, 而第一极体(PB)的排出率并不高, 且不易于收集检测, 为避免人为误差没有将卵母细胞的成熟作为实验终点的检测指标之一。实验中选择了易于观察和检测的卵泡形态学变化、卵泡直径变化、卵泡存活率、COCs排出率作为检测指标。

多柔比星对各种敏感癌株的 IC_{50} 在 $10 \mu\text{mol/L}$ 左右^[9], 即 $5.44 \mu\text{g/mL}$ 。本次所选用的剂量均在肿瘤细胞毒性浓度之下。在腔前卵泡培养的第2天加入多柔比星作用24 h, 可以观察到随着剂量的增高, 对卵泡的毒性相应增加, 在第4天可以明显观察到卵泡存活率降低, 发育迟缓, 随着培养时间的延长, 低剂量组的卵泡在缓慢恢复, 而高剂量组的存活率继续降低, 诱导排卵后COCs的排出率也显著性降低。在实验的第6天加入多柔比星作用24 h, 随着剂量的增加也可以观

察到非常明显的卵泡毒性, 卵泡漂浮不能良好贴壁, 基底膜模糊, 缺损或消失, 卵泡内出现黑色坏死区。颗粒细胞松散或游离到卵泡外, 卵泡轮廓也不规则, 卵母细胞逸出卵泡、萎缩或坏死形成退化闭锁卵泡, 部分卵泡生长停滞, 随着培养时间的延长也难以恢复。但由于一些相对较大的腔前卵泡在第6天发育较成熟, 因此在诱导排卵后也有COCs的排出, 但排出率较低, 高剂量组有显著性差异。一项长期对化疗药物临床应用生殖毒性的研究表明, 霍奇金病患儿进行化疗后, 有83%男童发生无精症, 而女童只有13%发生卵巢功能衰竭。结果表明性腺中的原始卵泡对细胞毒性的药物不敏感, 但对于已经开始生长的有腔卵泡毒性依然很强^[3]。在本次实验中也发现同样的现象, 虽然统计学上无显著性差异, 但从几个检测指标上可以看出, 已经发育的卵泡对多柔比星的作用更敏感。而接近发育终点D11的卵泡COCs的排出率在高剂量组与D2和D6染毒差别不大, 但低剂量时与第6天暴露多柔比星差别却比较明显, 可能与该阶段COCs已在卵泡内形成有关。由于多柔比星在高剂量时对不同发育阶段的卵泡均产生毒性作用, 抑制卵泡的发育、存活率及COCs的排出, 因此产生明显的卵巢毒性及卵巢功能障碍。

颗粒细胞通过间隙连接在卵母细胞的生长发育过程中起营养作用, 并促进卵母细胞的成熟, 颗粒细胞和膜细胞的相互作用是卵泡发育和维持正常功能的重要条件。作为卵泡发育的标志, 颗粒细胞的生长分化是原始卵泡启动和生长的关键, 并通过受体介导途径调控生长期卵泡的发育及卵泡闭锁, 从而在卵泡发育过程中起重要的调控作用^[10]。在本实验中, 第6天的卵泡与第2天卵泡最大的差别在于颗粒细胞大量增殖, 因此推测多柔比星的卵巢毒性机制作用靶点主要在颗粒细胞。在随后的机制研究我们将重点关注多柔比星对颗粒细胞的作用, 并对相关调控基因的变化进一步开展实验研究。

参考文献

- [1] Knobf MT. The influence of endocrine effects of adjuvant therapy on quality of life outcomes in younger breast cancer survivors[J]. *Oncologist*, 2006, 11 (2): 96-110.
- [2] Chemaitilly W, Mertens AC, Mithy P, et al. Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91 (5): 1723-1728.
- [3] Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, et al. American society of

(下转第368页)

- clinical oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24 (18): 2917-2931.
- [4] Ben-Aharon I, Bar-Joseph H, Tzarfaty G, et al. Doxorubicin-induced ovarian toxicity[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010, 8: 20.
- [5] Roti EC, Leisman SK, Abbott DH, et al. Acute doxorubicin insult in the mouse ovary is cell- and follicle-type dependent[J]. *PLoS One*, 2012, 7 (8): 42293.
- [6] Sun F, Betzendahl I, Shen Y, et al. Preantral follicle culture as a novel in vitro assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes[J]. *Mutagenesis*, 2004, 19 (1): 13-25.
- [7] 万旭英, 朱玉平, 马玺里, 等. 小鼠腔前卵泡体外培养方法的建立[J]. *卫生研究*, 2009, 38 (2): 153-158.
- [8] 梅树江, 林晓潭, 王晓梅, 等. 小鼠腔前卵泡体外培养成熟染色体分析技术的建立[J]. *癌变·畸变·突变*, 2009, 21 (6): 463-466.
- [9] 刘 晓, 邵方元, 陈宏远. 阿霉素抗肿瘤分子机制的研究进展[J]. *中国医药生物技术*, 2012, 7 (5): 373-375.
- [10] Cecconi S, Ciccarelli C, Barb eri M, et al. Granulosa cell oocyte interactions[J]. *Biol Reprod*, 2004, 115 (Sup 1): 19- 22.