

• 论 著 •      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.10.003

金钗石斛多糖对髓系白血病细胞 WT1 基因表达的影响\*

葛晓军<sup>1</sup>,郑丽梅<sup>2</sup>,王永伦<sup>1</sup>,唐彦萍<sup>3△</sup>  
(遵义医学院:1. 第一附属医院检验科;2. 第一附属医院中医科;  
3. 生物化学与分子生物学教研室,贵州遵义 563003)

**[摘 要]** **目的** 探讨金钗石斛多糖对髓系白血病细胞 WT1 基因表达的影响。**方法** 用 CCK8 方法检测金钗石斛多糖在 3 种白血病细胞中的 IC<sub>50</sub> 值;3 种细胞各分两组,对照组和处理组,对照组细胞保持正常生长,处理组给予金钗石斛多糖刺激。Hoechst33258 染色检测两组细胞凋亡情况,用 RT-PCR 检测 WT1 表达水平,Western blot 检测 WT1、P53 和 BAX 蛋白表达。**结果** 金钗石斛多糖在 3 种白血病细胞中具有相近的 IC<sub>50</sub> 值,HL-60、WEHI-3、K562 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为(110.71±6.49)、(104±48.50)、(96.66±5.10)mg/mL,3 种细胞的 IC<sub>50</sub> 值比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );处理组凋亡率高于对照组( $P<0.05$ );与对照组比较,处理组 WT1 基因、蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ),P53 和 BAX 蛋白表达增高。**结论** 金钗石斛多糖能明显降低 WT1 蛋白表达水平,且对白血病细胞有一定杀伤作用。

**[关键词]** 石斛;多糖;基因;肾母细胞瘤;白血病

**[中图分类号]** R733.71      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2015)10-1305-03

Study on effect of dendrobium nobile polysaccharides on expression of WT1 gene in myeloid leukemia cells\*  
Ge Xiaojun<sup>1</sup>,Zheng Limei<sup>2</sup>,Wang Yonglun<sup>1</sup>,Tang Yanping<sup>3△</sup>  
(1. Department of Clinical Laboratory,First Affiliated Hospital;2. Department of Traditional Chinese Medicine,First Affiliated Hospital;3. Department of Molecular Biology and Biochemistry,Zunyi Medical College,Zunyi,Guizhou 563003,China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of dendrobium nobile polysaccharides on the expression of the WT 1 gene in myeloid leukemia cells. **Methods** The CCK8 assay was used to detect the half maximal inhibitory concentration(IC<sub>50</sub>) of dendrobium nobile polysaccharides in 3 kinds of leukemia cells;the each kind of leukemia cells were divided into the treatment group and the control group. The cells in the control group maintained the normal growth,while which in the treatment group were given the dendrobium nobile polysaccharides stimulation. The Hoechst33258 staining was used to detect the apoptosis situation of the cells in the two groups. The WT 1 gene expression level was detected by the real-time PCR and the protein expression levels of WT1,53 and BAX were detect the Western blot. **Results** Dendrobium nobile polysaccharides had the similar IC<sub>50</sub> values in 3 kinds of myeloid leukemia cells,which were (110.71±6.49),(104±48.50),(96.66±5.10)mg/mL respectively,the difference among them had no statistical significance ( $P>0.05$ );the apoptosis rate of the treatment group was higher than that of the control group ( $P<0.05$ );the expression levels of WT1 gene and protein in the treatment group were decreased compared with the control group( $P<0.05$ ),while the expression of P53 and BAX protein was increased. **Conclusion** Dendrobium nobile polysaccharides can obviously decrease the expression level of WT1 protein,and has a certain killing effect on myeloid leukemia cells.

**[Key words]** dendrobium nobile;polysaccharide;gene,Wilms tumor;leukemia

肾母细胞瘤(wilms tumor,WT1)基因位于染色体 11p13 位点,研究者早期认为该基因为 Wilms 瘤的抑癌基因<sup>[1]</sup>。然而,随后越来越多的研究提示 WT1 基因可能作为调控造血细胞增生和(或)分化基因的转录抑制剂或激活剂,并且在白血病的发生、发展及预后中起重要的作用<sup>[2-4]</sup>。金钗石斛为兰科石斛属多年生附生草本植物,是中国传统名贵中药,金钗石斛有益胃生津、延年益寿、抗衰老、抗肿瘤和增强机体免疫力等作用<sup>[5]</sup>。它被制成石斛夜光丸等成品药。金钗石斛的药用成分主要是石斛碱及多糖类物质<sup>[6]</sup>。多糖类成分是石斛中具有免疫增强作用的活性成分<sup>[7]</sup>。本研究旨在探讨髓系白血病细胞在金钗石斛多糖干预下,采用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测 WT1 基因表达水平,确定金钗石斛多糖在髓系白血病中的药用价值。

**1 材料与方法**

**1.1 材料** 急性早幼粒细胞白血病 HL-60,慢性骨髓性白血

病细胞系 K-562,骨髓单核细胞白血病 WEHI-3 由华西科技园信号转导实验室馈赠。均用 RPMI-1640 含 10% FBS 培养;Hoechst33258 检测细胞凋亡试剂盒、RNA 提取试剂、逆转录试剂盒、SYBR-green I 试剂盒购自 TIGEN 公司;WT、p53、BAX 和内参 GAPDH 单克隆抗体购自 Abcam 公司。采用水提醇沉的方法提取金钗石斛多糖<sup>[8]</sup>。

**1.2 方法**

**1.2.1 CCK-8 检测金钗石斛多糖对 3 种细胞的 IC<sub>50</sub>** 分别收集对数生长期的细胞 HL-60、K-562、WEHI-3 重悬于 10% 小牛血清的 PRIM-1640 完全培养基,计数板计数,置于 96 孔培养板,每孔 4 000 个/100 μL,轻摇混匀,37 ℃ 5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养 24 h;次日将金钗石斛多糖按 10、30、60、100、200、300 mg/L 加入各孔内,每种细胞每种浓度各设置 3 个复孔,连续培养 48 h;48 h 后取出 96 孔板,每孔按 10∶1 的比例加入培养基与 CCK-8 的混合物,同时 在无细胞的孔内加入该混合物作为空

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960509/C190704)。 作者简介:葛晓军(1981—),主管技师,博士研究生,主要从事白血病发病原因和耐药机制研究。 △ 通讯作者,Tel:13312307061;E-mail:bifeng199421@126.com。

白对照,在无菌孵箱中避光培养 3 h;用 Micro-ELISA 仪测定每个孔的吸光度值,设定检测波长为 490 nm/630 nm;以药物浓度为横坐标,3 个孔的平均相对吸光度值为纵坐标,观察各细胞系的 IC<sub>50</sub>。以上实验重复 3 次。

**1.2.2 Hoechst33258 检测细胞凋亡** 取对数生长期的 3 种细胞,调整浓度为 1×10<sup>4</sup> 个/mL,以每孔 0.5 mL 接种于 24 孔板,RPMI-1640 含 10% FBS 培养 24 h 后,分为处理组和对照组,处理组加入 100 mg/kg 金钆石斛多糖,对照组不加药物处理。24 h 后,去除培养液,每孔加入 0.5 mL 固定液,固定 10 min;去除固定液,用 PBS 清洗 2 遍,每次清洗 3 min,去除液体;加入 0.5 mL Hoechst33258 染色液,染色 5 min,吸尽液体;滴 1 滴抗荧光猝灭剂于 24 孔板内,荧光显微镜观察。显微镜下每组细胞计数 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,取平均值,计算凋亡率。以上实验重复 3 次。

**1.2.3 RT-PCR 检测 3 组细胞 WT1 基因表达水平** 根据试剂盒说明书,用 Trizol 试剂盒提取对照组和处理组总 RNA,经过逆转录为 cDNA,保存于一 80 ℃ 冰箱或是继续后续实验。RT-PCR 检测处理组和对照组 WT1 基因表达水平。WT1 基因序列参照 Tamaki 等<sup>[9]</sup>报道方法,WT1 上游引物序列:5'-CCA CAG CAC AGG GTA CGA GAG-3',下游引物序列:5'-TCT CAG ATG CCG ACC GAT CAA-3',扩增片段长度 152 bp;内参基因 β-actin 上游引物:5'-CGC TGC TTG CCA ATA GTA AT-3',下游引物:5'-CCA CAG GCA TTG TGA TGG-3'。RT-PCR 反应条件为:2×SYBR-green mix 20 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,模板 1 μL,用超纯水扩容至 40 μL。条件为:94 ℃ 预变性 2 min;93 ℃ 变性 45 s;60 ℃ 退火 1 min;72 ℃ 延伸 30 s;共 40 个循环,每组 DNA 内参基因、目的基因各 3 管,同批次扩增,反应结束后由计算机自动计算定量结果。以上实验重复 3 次。

**1.2.4 Western blot 检测 WT1 蛋白表达情况** 取对数生长期细胞,按照上述分组,药物作用 24 h 后提取蛋白,根据 BCA

蛋白测试试剂盒说明书进行蛋白定量。蛋白样品与 loading buffer 按 1:1 混合后于 100 ℃ 中煮沸 5 min;取 20~40 μg 蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,浓缩胶电压 80 V,分离胶电压 120 V;湿法将蛋白转到 PVDF 膜上,恒流 260 mA,120 min;5%脱脂奶粉于室温封闭 2 h;PBS 稀释一抗,4 ℃ 缓慢振荡孵育过夜,PBS 洗 3 次,每次 10 min;TBST 稀释二抗,于室温孵育 2 h,TBST 洗 3 次,每次 5~10 min,避光;Odyssey 红外荧光检测仪扫描。以上实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 所有数据用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料用率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 3 种细胞系 IC<sub>50</sub> 检测结果比较** CCK-8 测得 3 种细胞在不同药物浓度下的吸光度值,绘制药剂剂量效应曲线,根据曲线估计各细胞系 IC<sub>50</sub> 范围,再以该范围内的药物浓度处理细胞,最终测得 HL-60 细胞的 IC<sub>50</sub> 为(110.71±6.49)mg/mL,WEHI-3 细胞的 IC<sub>50</sub> 为(104±48.50)mg/mL,K562 细胞的 IC<sub>50</sub> 为(96.66±5.10)mg/mL,3 种细胞的 IC<sub>50</sub> 值比较,差异无统计学意义(*P*>0.05),见图 1。

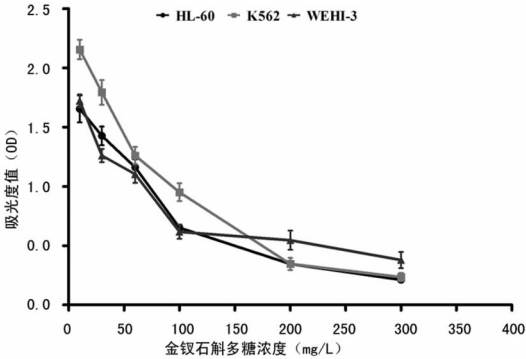


图 1 3 种细胞的金钆石斛多糖 IC<sub>50</sub> 值

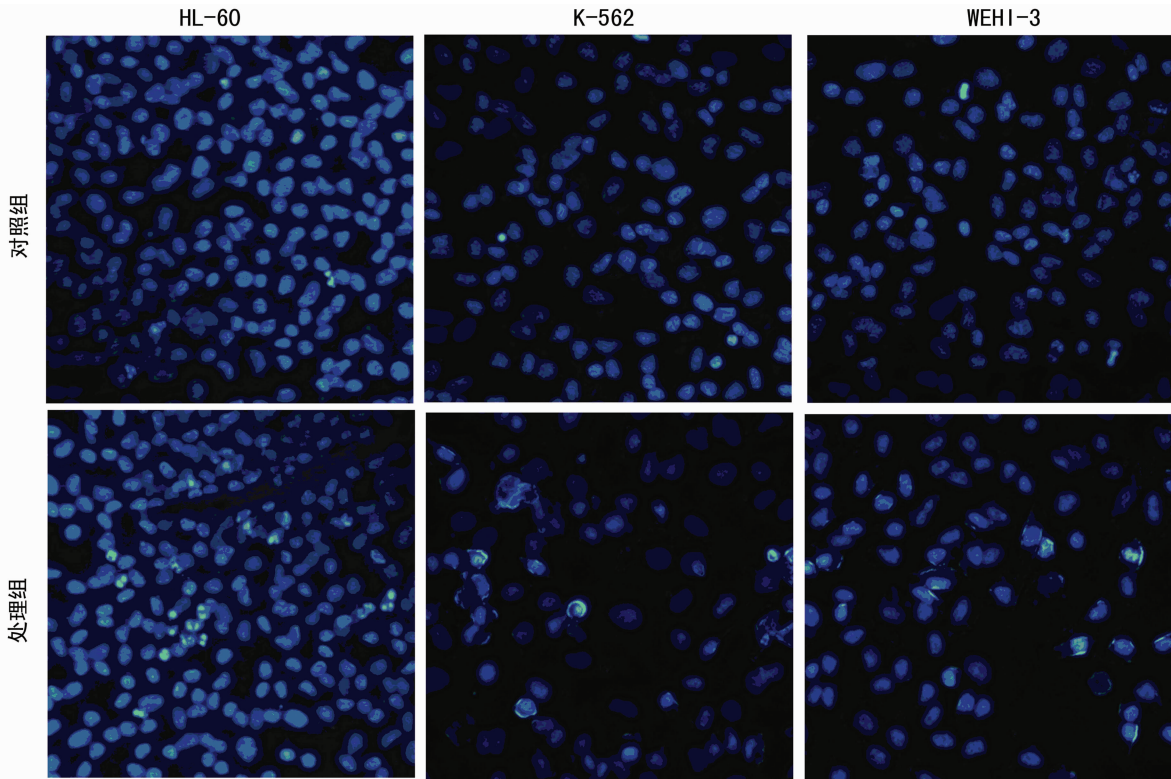


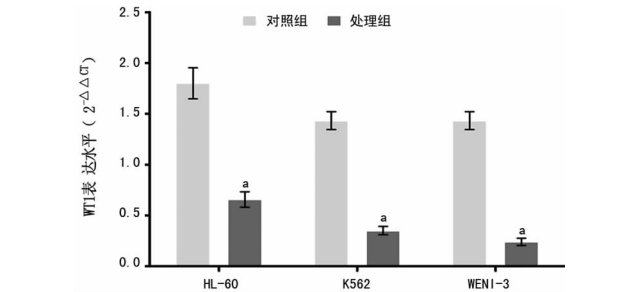
图 2 Hoechst33258 染色检测细胞凋亡(×200)

**2.2 细胞凋亡检测结果** 由于 3 种白血病细胞对金钗石斛多糖的 IC<sub>50</sub> 值接近,约为 100 mg/mL,故在 Hoechst33258 凋亡实验检测中,处理组均给予 100 mg/mL 金钗石斛多糖处理,对照组不加药物。经过 Hoechst 染色检测细胞凋亡,染色结束后,荧光显微镜下观察凋亡细胞,每组细胞观察 5 个视野,每个视野记数 100 个细胞,3 种白血病细胞处理组凋亡率均高于对照组( $P<0.05$ ),见表 1、图 2。

表 1 两组细胞凋亡检测结果比较(%)			
组别	HL-60 细胞	K562 细胞	WEHI-3 细胞
对照组	5.60	5.30	4.40
处理组	19.40 <sup>a</sup>	15.60 <sup>a</sup>	15.20 <sup>a</sup>

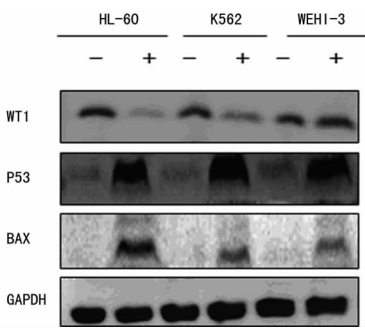
<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与对照组比较。

**2.3 3 种细胞系在金钗石斛多糖作用下 WT1 基因及蛋白表达比较** 金钗石斛多糖(100 mg/mL)刺激后,3 种白血病细胞处理组 WT1 基因表达水平均低于对照组(图 3);3 种白血病细胞处理组 WT1 蛋白表达降低,凋亡相关蛋白 P53 和 BAX 蛋白表达增加,见图 4。



<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与对照组比较。

图 3 两组细胞 WT1 基因表达比较



—:对照组;+:处理组。

图 4 两组细胞 WT1、P53 和 BAX 蛋白表达比较

3 讨 论

近几十年来,WT1 基因一直受到研究者和临床医生的关注,诸多的研究结果表明,WT1 基因与白血病的发生、发展和耐药方面都有相关性<sup>[10]</sup>。金钗石斛为兰科多年生草本植物,是中国的传统名贵中药材,具有极高的药用价值。金钗石斛的有效成分主要是石斛多糖和石斛碱,在本研究中,主要探讨石斛多糖的药理活性,多糖是生物有机体的主要成分之一,维持着生命的主要功能和活动,目前的研究指出,多糖可以增强生物体的免疫能力,且具有抗炎、抗肿瘤的作用<sup>[11]</sup>。本研究所用的金钗石斛产于贵州省赤水市,是国家质量监督检验检疫总局批准的地理标志产品,并认定金钗石斛为赤水道地药材。在前期的研究中,本课题组探讨了金钗石斛多糖对炎症因子脂多糖的作用,最终证明金钗石斛多糖具有抗炎的作用<sup>[12]</sup>;随后,在糖尿病研究中,也发现金钗石斛多糖可以改善糖尿病患

者的生存状态和缓解患者的症状<sup>[13]</sup>。有研究报道,大黄多糖、香菇多糖等可以通过调节肿瘤细胞免疫活性的机制来达到抑制肿瘤生长的目的<sup>[14]</sup>,因此,认为金钗石斛多糖对肿瘤细胞应该也具有较好的抑制作用。在本研究中,主要探讨了金钗石斛多糖对髓性白血病细胞的影响,首先通过 CCK8 实验,确定金钗石斛在 3 种白血病细胞中的 IC<sub>50</sub> 值;随后用 100 mg/L 的金钗石斛多糖刺激白血病细胞,经过 Hoechst33258 染色观察凋亡情况,可以明显看出,金钗石斛多糖刺激细胞后,细胞凋亡增加;通过荧光定量 PCR 和蛋白表达分析,加入金钗石斛多糖后,白血病细胞 WT1 蛋白表达减低。细胞凋亡和蛋白分析结果均表明,金钗石斛多糖对白血病细胞具有一定杀伤作用。很多研究都是通过 RT-PCR 或是荧光定量 PCR 来检测 WT1 基因的表达情况<sup>[15-16]</sup>,严格来讲,这两种实验方法只能反映 WT1 基因的 RNA 的表达情况,不能客观的反映实际的 WT1 蛋白表达水平。本实验采用 RT-PCR 和 Western blot 两种技术来检测 WT1 蛋白的表达水平,结果显示,在金钗石斛多糖刺激后,3 种白血病细胞的 WT1 表达减低,且凋亡相关的蛋白 P53 和 BAX 表达都是增高的,这也支持了 Hoechst33258 检测的凋亡结果。有研究表明,WT1 基因可以通过上调 bcl-2 的表达水平,来达到抗凋亡的目的<sup>[17]</sup>,在本研究中未见该蛋白表达。以往的报道中,WT1 作为一种转录调控因子,不仅可以上调很多生长因子的表达水平,如表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGF)和胰岛素生长因子(IGF)等,还可以上调这些生长因子的受体表达,从而导致细胞增殖速度增加<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,金钗石斛多糖可以通过抑制 WT1 的表达水平使白血病细胞凋亡增多,而 WT1 是否通过这些生长因子或是其受体来导致肿瘤的恶性增生,金钗石斛是否通过抑制 WT1 基因的表达水平进而导致肿瘤相关的生长信号表达下调,以及金钗石斛多糖对常规的化疗药物是否具有增敏作用,都需要进一步研究证实。

参考文献

[1] Hohenstein P,Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene,WT1[J]. Hum Mol Genetics,2006,15(2): R196-201.

[2] Keilholz U,Letsch A,Busse A,et al. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS[J]. Blood,2009,113(26):6541-6548.

[3] Tsuboi A,Oka Y,Nakajima H,et al. Wilms tumor gene WT1 peptide-based immunotherapy induced a minimal response in a patient with advanced therapy-resistant multiple myeloma[J]. Int J Hematol,2007,86(5):414-417.

[4] Paschka P,Marcucci G,Ruppert AS,et al. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia;a cancer and leukemia group B study[J]. J Clin Oncol, 2008,26(28):4595-4602.

[5] 管志斌,李再林. 珍稀名贵中药-金钗石斛[J]. 中国野生植物资源,2002,21(4):36-37.

[6] 王琳,叶庆生,刘伟. 金钗石斛研究概况[J]. 亚热带植物科学,2004,33(2):73-76.

[7] 杨艳,徐淑淑. 川、黔地区金钗石斛多糖的含量测定[J]. 中国药房,2010,21(27):2552-2554.

[8] 李小琼,葛晓军,郑斯卓,等. 金钗石斛多糖的提取及部分理化性质分析[J]. 江苏大学学报:医学(下转第 1310 页)

$\alpha 7$ nAChR 是 CAP 中的关键受体,它的兴奋介导了大部分的 ACh 在免疫系统中的效应<sup>[14]</sup>。IL-1 $\beta$  具有广泛的生物作用,可通过自分泌或旁分泌影响其他细胞因子和炎症介质的分泌,诱导抗原递呈细胞表面免疫分子的表达;其作为 T 细胞和 B 细胞的激活和分化因子,可介导免疫球蛋白的分泌、激活补体、杀伤细胞和吞噬细胞,增强由细胞免疫和体液免疫反应介导的组织损伤<sup>[15]</sup>。在药物诱导大鼠肝损伤模型中 IL-1 $\beta$  高表达,应用护肝药物后可抑制 IL-1 $\beta$  表达<sup>[16]</sup>,从而达到护肝作用。本实验结果显示,GSS 高剂量组  $\alpha 7$ nAChR 受体表达较模型组明显升高,而 IL-1 $\beta$  水平明显降低,提示 GSS 可激活 CAP,从而减少致炎细胞因子如 IL-1 $\beta$  的表达,通过抑制炎症反应对抗 CCL<sub>4</sub> 诱导的小鼠慢性肝损伤。

## 参考文献

- Lin AH, Leung GP, Leung SW, et al. Genistein enhances relaxation of the spontaneously hypertensive rat aorta by transactivation of epidermal growth factor receptor following binding to membrane estrogen receptors- $\alpha$  and activation of a G protein-coupled, endothelial nitric oxide synthase-dependent pathway[J]. *Pharmacol Res*, 2011, 63(3):181-189.
- Ono M, Koga T, Ueo H, et al. Effects of dietary genistein on hormone-dependent rat mammary carcinogenesis induced by ethyl methanesulphonate[J]. *Nutr Cancer*, 2012, 64(8):1204-1210.
- Park YJ, Jang Y, Kwon YH. Protective effect of isoflavones against homocysteine-mediated neuronal degeneration in SH-SY5Y cells[J]. *Amino Acids*, 2010, 39(3):785-794.
- Li YQ, Xing XH, Wang H, et al. Dose-dependent effects of genistein on bone homeostasis in rats' mandibular subcondral bone[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(1):66-74.
- Choi JS, Song J. Effect of genistein on insulin resistance, renal lipid metabolism, and antioxidative activities in ovariectomized rats[J]. *Nutrition*, 2009, 25(6):676-685.
- 薛进华, 睦荣燕, 黄静瑶, 等. 脑缺血再灌注损伤时细胞因子的改变及染料木素的干预作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(22):191-195.
- Babu PV, Si H, Fu Z, et al. Genistein prevents hyperglycemia-induced monocyte adhesion to human aortic endothelial cells through preservation of the cAMP signaling pathway and ameliorates vascular inflammation in obese diabetic mice[J]. *J Nutr*, 2012, 142(4):724-730.
- 索志荣, 张尊听, 郑建斌, 等. 染料木素磺酸钠制备及其抗脂质过氧化作用[J]. *应用化学*, 2005, 22(10):1083-1086.
- 钟星明, 黄志华, 龚衍, 等. 染料木素磺酸钠对脑缺血再灌注损伤的保护作用及 DREAM 和 PSD95 的表达变化[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 30(8):697-699.
- 宋敏, 于季军, 杨丹彤, 等. 菟丝子黄酮对慢性肝损伤保护作用的研究[J]. *湖南农业科学*, 2010, 40(23):151-153.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin[J]. *Nature*, 2000, 405(6785):458-462.
- Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway in intracerebral hemorrhage[J]. *Brain Res*, 2010(1309):164-171.
- Tracey KJ. Reflex control of immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(6):418-428.
- Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation[J]. *Lett Nature*, 2003, 421(23):84-88.
- Glasgow SC, Ramachandran S, Csontos KA, et al. Interleukin-1 beta is prominent in the early pulmonary inflammatory response after hepatic injury[J]. *Surgery*, 2005, 138(1):64-70.
- 陈盛, 何念海, 罗则佳, 等. 内毒素诱导 D-半乳糖胺致敏大鼠急性肝损害相关指标的动态观察[J]. *重庆医学*, 2013, 42(6):651-654.
- (收稿日期:2014-11-15 修回日期:2014-12-20)
- (上接第 1307 页)
- 版, 2008, 18(5):446-447.
- Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, et al. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes[J]. *Leukemia*, 1999, 13(3):393-399.
- Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia[J]. *Blood*, 2003, 101(5):1698-1704.
- 郑晓珂, 曹新伟, 冯卫生, 等. 金钗石斛的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2005, 14(7):826-829.
- 李小琼, 金徽, 葛晓军, 等. 金钗石斛多糖对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$  · NO 的影响[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(28):13634-13635.
- 陶凤, 金徽, 杨贵忠, 等. 金钗石斛水提物对糖尿病大鼠肾组织非酶糖基化及氧化的影响[J]. *山东大学学报:医学版*, 2012, 50(10):50-55.
- 付书婕, 王乃平, 黄仁彬. 植物多糖免疫调节作用的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(1):99-101.
- Weisser M, Kern W, Rauhut S, et al. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2005, 19(8):1416-1423.
- Tamaki H, Mishima M, Kawakami M, et al. Monitoring minimal residual disease in leukemia using real-time quantitative polymerase chain reaction for Wilms tumor gene (WT1) [J]. *Int J Hematol*, 2003, 78(4):349-356.
- 赵谢兰, 雷瑚仪, 高欣, 等. 急性髓性白血病骨髓细胞 NF- $\kappa$ B 活性及其与 WT1 和 Bcl-2 表达的关系[J]. *中国医师杂志*, 2006, 8(7):880-882.
- Chabbert-Buffet N, Bouchard P. The normal human menstrual cycle[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2002, 3(3):173-183.
- (收稿日期:2014-10-18 修回日期:2014-12-15)