

## 复方麦芽丸对多囊卵巢综合征模型大鼠 LH、FSH 表达的影响

兰楠<sup>1</sup>, 杨洋博君<sup>2</sup>, 邱文平<sup>1</sup>, 陈蓉<sup>1\*</sup><sup>1</sup>重庆医科大学中医药学院中医药研究室; <sup>2</sup>重庆市第十三人民医院, 重庆 400016

**摘要:** 本文旨在研究复方麦芽丸(Compound Malt Pill, CMP)对多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)大鼠黄体生成素(LH)、促卵泡激素(FSH)表达的影响。通过运用9日龄SD大鼠颈背部皮下注射丙酸睾酮建立PCOS模型,造模成功的大鼠随机分为模型组,达英-35组和CMP低、中、高剂量组( $n=9$ ),另设正常组( $n=10$ )。各治疗组以相应药物灌胃,正常组及模型组灌以等量的蒸馏水。运用免疫组化、PCR测定卵巢组织LH、FSH的蛋白及mRNA表达。结果显示,模型组中LH的蛋白及mRNA表达较正常组显著升高( $P<0.01$ ),CMP各剂量组LH蛋白及mRNA表达较模型组显著降低( $P<0.01$ ),达英-35组LH蛋白表达较模型组显著降低( $P<0.01$ ),mRNA表达较模型组无显著差异( $P>0.05$ );模型组中FSH的蛋白及mRNA表达较正常组显著降低( $P<0.01$ ),各治疗组FSH蛋白及mRNA表达较模型组显著升高( $P<0.01$ ),研究结果表明,PCOS模型大鼠LH表达明显升高,FSH表达明显降低;复方麦芽丸对PCOS有治疗作用,可能是通过调节LH、FSH表达水平实现的。

**关键词:** 多囊卵巢综合征;复方麦芽丸;黄体生成素;促卵泡激素

中图分类号:R271.19

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.2.022

## Effects of Compound Malt Pill on the Expression of LH and FSH in Polycystic Ovary Syndrome Model Rats

LAN Nan<sup>1</sup>, YANG Yang-bojun<sup>2</sup>, QIU Wen-ping<sup>1</sup>, CHEN Rong<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Traditional Chinese Medicine Research Laboratory, College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University; <sup>2</sup>The Thirteen People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400016, China

**Abstract:** The objective of study was to investigate the effect of compound malt pill (CMP) on the expression of LH and FSH in polycystic ovary syndrome model rats. The 9-day-old rats were given the subcutaneous injection of testosterone propionate for inducing PCOS. The model rats were randomly divided into 5 groups ( $n=9$ ): the model group, Diane-35 group, high-, middle-, low-dose CMP group. 10 rats with normal estrus cycles were set as the normal group. The treatment groups were given intragastric administration with corresponding drugs, the normal group and the model group were given distilled water. The protein and mRNA expression levels of LH and FSH were detected by immunohistochemistry and PCR. The results showed that the protein and mRNA expression of LH were significantly increased in model group than that in normal group ( $P<0.01$ ), compared with model group, the protein and mRNA expression of LH were significantly decreased in CMP each dose group ( $P<0.01$ ), the protein expression of LH was significantly decreased in Diane-35 group ( $P<0.01$ ) and the mRNA expression of LH was not significantly different ( $P>0.05$ ). The protein and mRNA expression of FSH were significantly decreased in model group than that in normal group ( $P<0.01$ ), the protein and mRNA expression of FSH were significantly increased in each treatment group than that in model group ( $P<0.01$ ). Hence, it was concluded that, the protein and mRNA expression of LH was significantly increased and FSH was significantly decreased in PCOS model rats. The therapeutic effect of compound malt pill on PCOS can be achieved, and its possible mechanism is related to regulating the protein and mRNA expression level of LH and FSH in ovarian tissue.

**Key words:** compound malt pill; polycystic ovary syndrome; LH; FSH

多囊卵巢综合征 (Polycystic ovary syndrome, P-

COS) 是女性最常见的内分泌紊乱疾病, 在育龄期妇女中发病率为 6% ~ 10%, 甚至高达 15%<sup>[1]</sup>。目前对 PCOS 的病因病理、诊断标准等多个问题存在诸多争议。其病因病理研究中发现, 下丘脑-垂体-卵巢轴功能紊乱是其发病的重要原因, 表现为血清促

收稿日期: 2016-10-25 接受日期: 2016-12-29

基金项目: 重庆市卫生局重点课题 (ZY-20131003)

\* 通讯作者 Tel: 86-015310094970; E-mail: lannan\_into@qq.com

性腺激素的改变,如促卵泡激素(Follicle-stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)。国际上先后有多个被广泛应用的诊断标准,加上2011年中国卫生部发布的中国PCOS诊断标准中,都未将LH、LH/FSH的改变列为诊断标准之一,但日本妇产科学会的本国大样本临床研究发现LH、LH/FSH升高是PCOS的重要特征。陈蓉教授在多年临床工作中亦发现,PCOS患者存在LH、LH/FSH升高的情况,自拟复方麦芽丸治疗本病,疗效显著<sup>[2]</sup>。本实验运用免疫组化、PCR方法检测该复方麦芽丸对PCOS模型大鼠LH、FSH蛋白及基因表达的影响,为指导临床提供依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

9日龄健康SPF级SD雌性大鼠60只,购买并饲养于重庆医科大学实验动物中心[许可证号:SYXK(渝)2012-0002]。

### 1.2 药品及试剂

复方麦芽丸组成有麦芽30g,肉苁蓉、菟丝子、枸杞子、熟地、山茱萸、女贞子、墨旱莲各12g,淫羊藿、仙茅、巴戟天、泽泻、丹皮、当归、知母、黄柏各9g,甘草6g。中药经重庆医科大学中医药研究室何先元教授鉴定。达英-35(即炔雌醇环丙孕酮片,拜耳医药保健有限公司,批号:1720),丙酸睾酮注射液(上海通用药业股份有限公司,批号:130610)。FSH、LH抗体购自北京博奥森生物技术有限公司(批号分别为:bs-1536R、bs-0051R),兔SP检测试剂盒、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司(批号分别为:15121A04、K155213C)。TRNzol总RNA提取试剂购自北京天根生化科技有限公司,Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒购自TOYOBO公司,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)购自上海沪尚生物科技有限公司。

### 1.3 仪器与设备

低温高速离心机(Sigma公司),电泳仪、凝胶成像仪、CFX PCR仪(美国Bio Rad公司),BX51正置显微镜(Olympus)。

## 2 实验方法

### 2.1 实验药物制备

根据《药理与中药药理实验》<sup>[3]</sup>中的方法计算药物剂量,CMP低、中、高剂量组浓度分别为0.315

g丸药/mL、0.63g丸药/mL、1.26g丸药/mL,制备为中药煎剂以便实验给药,灭菌后4℃冰箱保存。

### 2.2 造模

60只大鼠随机选取10只设为正常组,剩余大鼠参考俞瑾等<sup>[4]</sup>的造模方法运用丙酸睾酮造模,每只大鼠于颈背部皮下注射丙酸睾酮0.05mL(即1.25mg),由母鼠哺乳至21日龄断乳,70日龄起连续10d行大鼠阴道脱落细胞学检查,若阴道涂片显示无规律动情周期、上皮细胞呈持续性角化状态者,则为造模成功。剔除涂片结果不典型者5只。

### 2.3 分组及给药

将造模成功的45只大鼠随机分为5组:模型组、达英-35组、CMP低、中、高剂量组,每组9只。自第81日龄开始,正常组和模型组按1mL/100g灌以蒸馏水,达英-35组以等量的炔雌醇环丙孕酮片水溶液灌胃,CMP各剂量组分别灌以等量的相应浓度中药煎剂。各组大鼠均每日灌胃1次,连续21d。

### 2.4 标本采集

末次灌胃后禁食过夜,翌日早晨称重。3%戊巴比妥钠按1mL/kg腹腔注射,麻醉起效后迅速分离双侧卵巢,一侧卵巢装入冻存管,置于-80℃冰箱中保存,另一侧用10%多聚甲醛固定。

### 2.5 观察指标

#### 2.5.1 大鼠阴道脱落细胞涂片观察

于70日龄起连续10d行阴道涂片观察。用移液枪吸取100μL生理盐水并打入大鼠阴道,反复抽吸3-4次,吸出液体轻轻涂抹于已标记的清洁载玻片上,待风干后行瑞氏染色,烘干玻片后中性树脂封片,置于镜下观察并采集图像。

#### 2.5.2 PCR检测卵巢组织FSH、LH基因表达

根据GenBank上所查mRNA序列设计引物,引物序列:LH上游5'TPGCTCCCGTGCCTCAG3',下游5'GGGAAGGTCACAGGTCATTGG3',产物长度195bp;FSH上游5'GCAGCCAACTATGATTACATAGTTC3',下游5'TAGGGGTTAGCGTAACTTCAGTG3',产物长度249bp;GAPDH上游5'GGGGTGATGCTGCTGCTGAGTATG3',下游5'CCGCCTGCTTCACCACCTTCTT3',产物长度536bp。取出冻存的大鼠卵巢组织,加入1ml TRNzol充分匀浆后提取总RNA,检测总RNA浓度及其纯度,在反应体系中加入逆转录酶MMLV,37℃水浴60min,逆转录合成cDNA。PCR反应条件:94℃预变性5

min, 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次, 72 °C 延伸 10 min。取 10 μL PCR 产物上样后电泳, 凝胶成像系统成像并保存图片。采用 Quantity One 4. 6. 2 软件分析图像, 目标基因与 GAPDH 之比即为各组卵巢组织 FSH、LH 基因的相对表达量。

### 2.5.3 免疫组化法检测卵巢组织 FSH、LH 蛋白表达

切片置于金属染色架上并放入二甲苯中, 放进烤箱中脱蜡约 2 h, 梯度酒精水化, 清水冲洗后沥干; 放入 0.01M 枸橼酸缓冲液中加热至 95 °C 做抗原修复, 维持约 15 min 后冷却至室温, PBS 冲洗; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 滴加在组织上, 室温静置 15 min, PBS 冲洗; 山羊血清封闭液滴加在组织上, 37 °C 30 min; 倾去山羊血清封闭液直接滴加一抗 (1:100), 4 °C 冰箱过夜孵育; 第二日取出湿盒 37 °C 45 min 复温, 倾去一抗, PBS 冲洗; 滴加生物素二抗 (1:1000), 37 °C 30 min, PBS 冲洗; 滴加辣根酶标记链霉卵白素, 37 °C 30 min, PBS 冲洗; 滴加 DAB 染色液 (现配 1:20), 显微镜下掌握显色程度, 显色后置于清水中终止; 苏木

精复染, 盐酸酒精分化, 自来水冲洗 10 min; 烘干, 透明, 中性树脂封片。NIKON TE2000-U 荧光倒置显微镜采集图像, 运用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析图像, 测定阳性区域的光密度值。

### 2.6 统计学处理

运用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析, 数据以均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较运用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 大鼠阴道脱落细胞涂片观察

正常组大鼠可观察到规律的动情前期、动情期、动情后期、动情间期, 周期约为 4 ~ 5 d。成模的 SD 大鼠, 观察到阴道上皮细胞持续性角化, 提示无排卵, 无规律的动情周期变化。发情前期阴道涂片可见大量椭圆形有核上皮细胞, 少量角化上皮细胞和白细胞; 发情期可见占绝大多数的片状角化上皮细胞; 发情后期三种细胞均可见, 比例无明显差异; 发情间期可见白细胞占多数, 其余两种细胞很少, 见图 1。

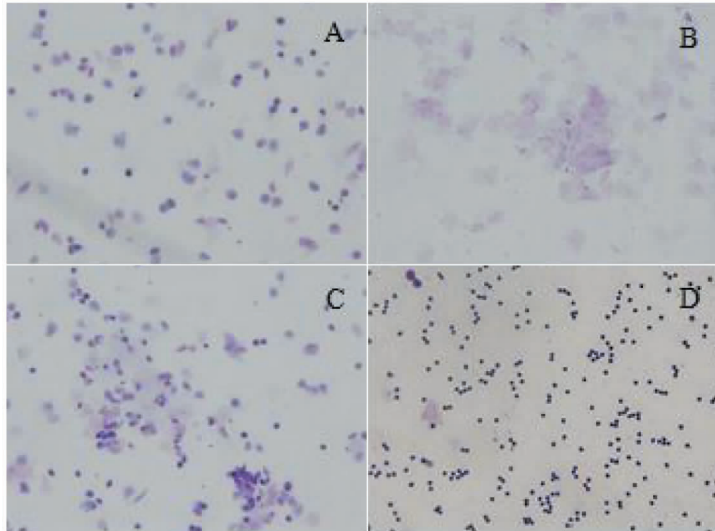


图 1 SD 大鼠动情前期 (A)、动情期 (B)、动情后期 (C) 及动情间期 (D) 的阴道涂片观察

Fig. 1 Vaginal smears of rats on estrous cycle phases: Proestrus (A), Estrus (B), Metestrus (C) and Diestrus (D)

### 3.2 PCR 结果

大鼠卵巢组织 LH mRNA 表达水平: 模型组较正常组显著升高 ( $P < 0.01$ ), CMP 各剂量组较模型组显著降低 ( $P < 0.01$ ), 达英-35 组较模型组无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。复方麦芽丸各剂量组与达英-35 组比较, 均有显著差异 ( $P < 0.01$ )。大鼠卵巢组

织 FSH mRNA 表达水平: 模型组较正常组显著降低 ( $P < 0.01$ ), 各治疗组较模型组显著升高 ( $P < 0.01$ ), 复方麦芽丸各剂量组与达英-35 组比较, 高剂量组有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 低、中剂量组无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 见图 2、表 1。

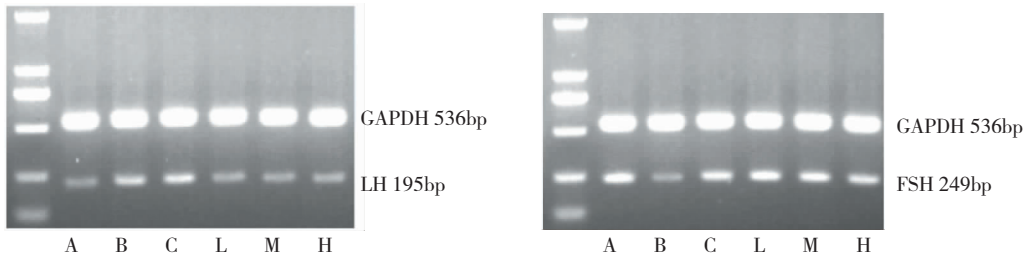


图2 正常组(A)、模型组(B)、达英-35组(C)、CMP低剂量(L)、中剂量(M)、高剂量(H)大鼠卵巢组织LH和FSH mRNA的表达

Fig. 2 The expression of LH and FSH mRNA in ovarian tissues of rats from normal group (A), model group (B), Diane-35 group (C), low-dose group (L), middle-dose group (M), high-dose group (H)

表1 复方麦芽丸(CMP)对大鼠卵巢组织LH、FSH mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of Compound Malt Pill on the mRNA expression of LH and FSH in ovarian tissue of polycystic ovary syndrome model rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	n	LH	FSH
正常组 Normal	10	0.27 ± 0.01 **	0.63 ± 0.02 **
模型组 Model	9	0.51 ± 0.01	0.28 ± 0.02
达英-35组 Diane-35	9	0.52 ± 0.01	0.54 ± 0.01 **
CMP低剂量组 Low-dose	9	0.33 ± 0.01 **△△	0.56 ± 0.01 **
CMP中剂量组 Middle-dose	9	0.32 ± 0.01 **△△	0.55 ± 0.01 **
CMP高剂量组 High-dose	9	0.33 ± 0.01 **△△	0.51 ± 0.02 **△

注:与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 复方麦芽丸与达英-35比较, △  $P < 0.05$ , △△  $P < 0.01$ 。

Note: compared with model group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; CMP compared with Diane-35 group, △  $P < 0.05$ , △△  $P < 0.01$ .

### 3.3 免疫组化结果

在胞核或胞浆中出现棕黄色或棕色颗粒为阳性反应,运用IPP 5.0图像分析软件,测定阳性细胞面积及光密度值,计算平均光密度值并进行统计分析。大鼠卵巢组织LH蛋白表达水平:模型组较正常组

显著升高( $P < 0.01$ ),各治疗组较模型组显著降低( $P < 0.01$ ),复方麦芽丸各剂量组与达英-35组比较,均无显著差异( $P > 0.05$ )。大鼠卵巢组织FSH蛋白表达水平:模型组较正常组显著降低( $P < 0.01$ ),各治疗组较模型组显著升高( $P < 0.01$ ),复

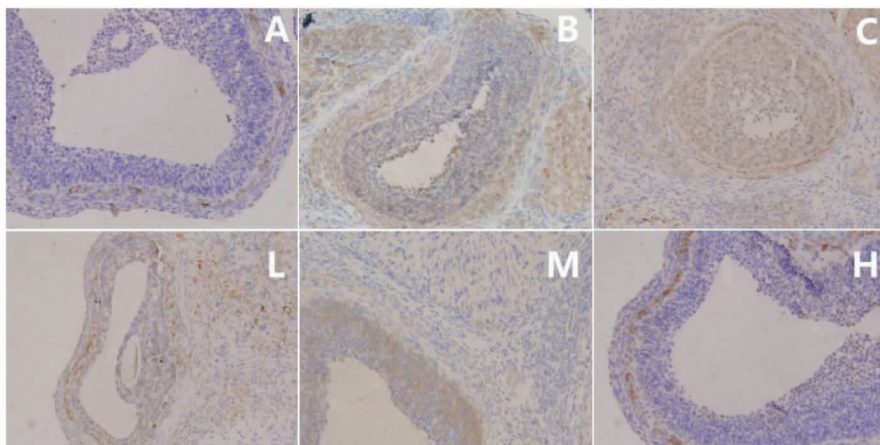


图3 正常组(A)、模型组(B)、达英-35组(C)、CMP低剂量(L)、中剂量(M)、高剂量(H)大鼠卵巢组织LH表达(SP × 400)

Fig. 3 The expression of LH in ovarian tissue of rats from normal group (A), model group (B), Diane-35 group (C), low-dose group (L), middle-dose group (M), high-dose group (H) (SP × 400)

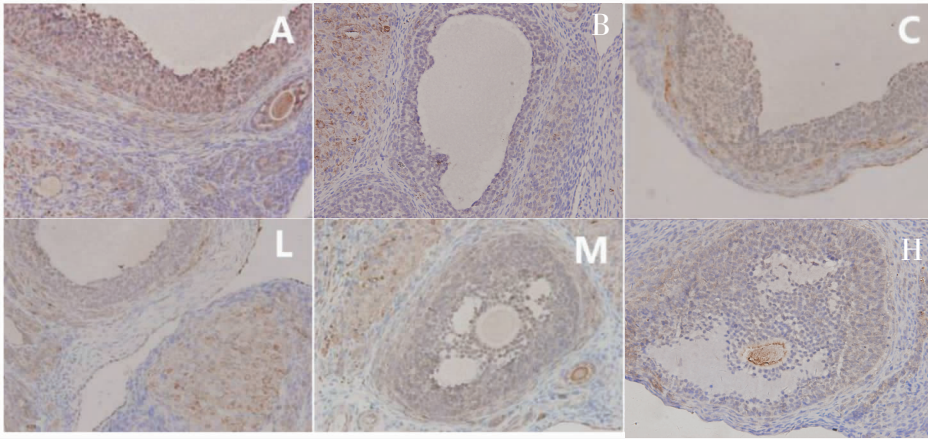


图4 正常组(A)、模型组(B)、达英-35组(C)、CMP低剂量(L)、中剂量(M)、高剂量(H)大鼠卵巢组织FSH表达(SP×400)

Fig. 4 The expression of FSH in ovarian tissue of rats from normal group(A), model group(B), Diane-35 group(C), low-dose group(L), middle-dose group(M), high-dose group(H) (SP×400)

表2 复方麦芽丸(CMP)对大鼠卵巢组织LH、FSH蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of Compound Malt Pill on the protein expression of LH and FSH in ovarian tissue of polycystic ovary syndrome model rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	n	LH	FSH
正常组 Normal	10	0.14 ± 0.01 **	0.23 ± 0.02 **
模型组 Model	9	0.29 ± 0.02	0.12 ± 0.02
达英-35组 Diane-35	9	0.18 ± 0.02 **	0.18 ± 0.01 **
CMP低剂量组 Low-dose	9	0.18 ± 0.02 **	0.18 ± 0.02 **
CMP中剂量组 Middle-dose	9	0.17 ± 0.03 **	0.19 ± 0.02 **
CMP高剂量组 High-dose	9	0.17 ± 0.02 **	0.19 ± 0.02 **

注:与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 复方麦芽丸与达英-35比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note: compared with model group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . CMP compared with Diane-35 group,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ .

方麦芽丸各剂量组与达英-35组比较,各剂量组均无显著差异( $P > 0.05$ ),见图3、图4,表2。

## 4 讨论与结论

多囊卵巢综合征患者稀发排卵或无排卵,而规律的排卵性月经周期依赖于正常的下丘脑-垂体-卵巢轴(Hypothalamus-Pituitary-Ovarian Axis, HPOA)功能。HPOA调控卵泡发育,需要适量的FSH、LH,且要求二者比例协调,其中任一因素异常都有可能导导致卵泡发育异常或排卵障碍<sup>[5]</sup>。

LH和FSH是由垂体前叶促性腺细胞产生和分泌的两种糖蛋白激素,在调节生殖功能中起着至关重要的作用<sup>[6]</sup>。LH有以下作用:1)卵泡早期与窦前卵泡、窦状卵泡中的卵泡膜细胞的LH受体相结合,通过P450<sub>sc</sub>、P450<sub>c17</sub>和3 $\beta$ 羟类固醇脱氢酶基因的转录,生成雄激素,主要是雄烯二酮,为雌二醇的合成提供底物;2)排卵前与卵母细胞的LH受体

结合,促使卵母细胞减数分裂至最终成熟及排卵;3)排卵后维持黄体功能,促进雌二醇、孕激素等的合成与分泌<sup>[7,8]</sup>。FSH的作用有:1)促使窦前卵泡及窦状卵泡的颗粒细胞增殖及分化,从而促进卵泡生长发育与成熟;2)激活颗粒细胞芳香化酶,合成与分泌雌二醇;3)在前一周期的黄体晚期及卵泡早期,促进窦卵泡群的募集;4)促使颗粒细胞合成分泌抑制素、激活素等物质,调节优势卵泡的选择和非优势卵泡的闭锁退化;5)诱导自身受体的形成,增强FSH对卵泡生长发育的促进作用;6)卵泡晚期与雌激素协同,诱导颗粒细胞生成LH受体,从而为排卵及黄素化作准备<sup>[8,9]</sup>。

PCOS患者LH水平升高,且较恒定地维持在正常妇女月经周期中的卵泡期水平,FSH则相当于早卵泡期水平,因此LH/FSH > 2-3<sup>[10]</sup>。LH过高,使卵泡膜细胞分泌的雄激素增多,造成卵泡内高雄激素的微环境,可引起卵泡发育闭锁,患者表现为月经稀

发或闭经。同时,过量的 LH 诱导卵母细胞过早成熟,排卵时的卵子已经是老龄卵,导致受精力低下或受精后着床力低下,表现为正常月经周期的不孕或(及)早期流产。排卵前 LH 峰过早还会导致颗粒细胞黄素化,使卵母细胞质量下降<sup>[11-13]</sup>。FSH 水平偏低,使芳香化酶所依赖的 FSH 相对不足,因此不能充分地使雄激素芳香化为雌激素,以致卵泡局部雄激素偏多,雌激素偏少,最终导致卵泡不能发育成熟,呈长期无排卵状态<sup>[12]</sup>。

根据 PCOS 的临床表现,其可归属于中医的“崩漏”、“月经后期”、“闭经”、“不孕症”等范畴。PCOS 病因病机复杂,与肾、肝、脾三脏功能失调密切相关,以肾虚为主,同时涉及痰湿、血瘀等病理因素。陈蓉教授既往运用麦芽治疗围绝经期综合征过程中发现,麦芽能够调节雌鼠的性腺激素水平<sup>[14]</sup>,由此思考在治疗 PCOS 这一内分泌紊乱性疾病时运用麦芽,结合中医基础理论和多年临床经验,组成以麦芽为主药的复方麦芽丸,临床疗效显著<sup>[2]</sup>。方中麦芽健脾消食,兼疏肝解郁;巴戟天、仙茅、菟丝子、肉苁蓉、淫羊藿补肾助阳;枸杞子、墨旱莲、女贞子、熟地、山茱萸滋补肝肾;知母、泽泻、黄柏滋肾阴、泻相火;丹皮、当归活血化瘀;甘草调和诸药。全方共奏补肾健脾、活血祛瘀之效,以补肾为主,标本兼顾。本研究结果表明,PCOS 模型大鼠动情周期紊乱,卵巢组织 LH 表达水平显著升高,FSH 表达水平显著降低,各治疗组均能显著降低 LH 水平,升高 FSH 水平,复方麦芽丸各剂量组 LH 基因表达与达英-35 组比较均有显著差异,高剂量组 FSH 基因表达与达英-35 组比较有统计学意义。达英-35 目前已成为治疗 PCOS 的首选方法之一,但不能改善糖、脂代谢状态,且有可能增加患者体重,降低患者胰岛素敏感性,将加重胰岛素抵抗<sup>[15]</sup>。复方麦芽丸与之相比,副作用少、临床疗效好,其作用机制可能是通过调控 LH、FSH 的蛋白及基因表达,调节性激素水平,促进卵泡的发育及成熟,从而治疗 PCOS。本研究为复方麦芽丸应用于临床治疗 PCOS 提供了一定的实验依据。

#### 参考文献

1 Orio F, Muscogiuri G, Nese C. Obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk: an update in the management of polycystic ovary syndrome. *Eur J ObstetGynecol Reprod Biol*, 2016, 8: 1-6.

2 Chen R (陈蓉), Yang YBJ (杨洋博君), Ling HF (令狐华). Clinical observation on treating 83 cases of PCOS with the complicated Maiya pill. *Clin Res Chin Med* (中医临床研究), 2013, 5: 82-83.

3 Peng C (彭成). *Pharmacology and Pharmacology Experiment of traditional Chinese Medicine*. Beijing: Science Press, 2008. 3-6.

4 Yu J (俞瑾), Zhang J (张洁), Han J (韩洁), et al. Mechanism of BushenHuoxueHuantan Recipe on reducing hyperandrogenism in androgen induced sterile rats. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2013, 34: 498-501.

5 Fu LM (付灵梅), Tan ZY (谭朝阳), Wang LJ (王丽君), et al. Influence of fluoritum on rats with ovarian failure and level of FSHR and LHR. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2011, 17: 184-186.

6 Strauss JF, Barbieri RL. Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006.

7 Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev*, 2002, 23: 141-74.

8 Xie X (谢幸), Gou WL (苟文丽). *Obstetrics and Gynecology*. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013: 25.

9 Li MZ (李美芝). *Gynecological Endocrinology*. Beijing: People's Military Medical Press, 2000: 35-40, 199-214.

10 Li MZ (李美芝). The diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome. *Chin J ObstetGynecol* (中华妇产科杂志), 2002, 37: 444-446.

11 Filicori M, Cognigni GE. Clinical review 126: Roles and novel regimens of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in ovulation induction. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 1437-1441.

12 He SY (何淑莹), Shen YH (申玉华), You ZL (尤昭玲). Research progress on LH and FSH in PCOS. *Guid J TCM* (中医药导报), 2005, 11: 82-84.

13 He B (何冰), Cheng JP (程俊萍), Huang L (黄莉), et al. The role of luteotropic hormone in the follicular development and controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproduction. *Chin J New Clin Med* (中国临床新医学), 2012, 5: 656-659.

14 Chen R (陈蓉), Zhang JH (张建华), Ou R (欧荣). The effect of Maiya on hormone level of female mice. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2006, 13: 35-36.

15 Feng QF (冯巧飞). Clinical study of insulin sensitizer combined with Diane-35 in treating of polycystic ovary syndrome. Guangzhou: Southern Medical University (南方医科大学), PhD. 2009.