

DOI: 10.13376/j.cbbls/2016014

文章编号: 1004-0374(2016)01-0107-05

哺乳动物卵巢生殖干细胞的研究进展与争议

赵琰誉, 刘 英*

(首都医科大学附属北京妇产医院生殖医学科, 北京 100026)

摘要: 关于雌性哺乳动物卵子再生的问题一直存有争议, 1951年后人们普遍认为卵子数会随年龄增长而下降, 不存在再生。近年来有学者对此提出质疑, 他们在研究小鼠卵子凋亡时发现, 卵巢内可能存在具有有丝分裂活性的生殖干细胞, 随即引起了激烈讨论。虽然有一些实验结果对卵巢生殖干细胞的存在提出质疑, 但是越来越多的研究提供了其存在的证据。卵巢生殖干细胞的研究一旦成熟, 对基础及临床将具有深远影响。现对卵巢生殖干细胞的发现和研究现状及潜在应用展开综述。

关键词: 卵巢; 生殖细胞; 干细胞; 卵子再生

中图分类号: Q954.43 **文献标志码:** A

Research progress and controversy of ovarian germ stem cells in mammals

ZHAO Yan-Yu, LIU Ying*

(Department of Reproductive Medicine, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital,
Capital Medical University, Beijing 100026, China)

Abstract: It is generally believed that postnatal female mammals had definite ovarian reserve and the follicles decreased with age. However in recent years, studies have shown that cells with mitotic activity may exist in mouse ovaries. Although the existence of ovarian germline stem cells is still unresolved at present, there is a growing number of studies revealing that female mammals may have a population of renewable cells in the ovaries. Once the research of ovarian germline stem cells has matured, it may have a profound impact on basic and clinical medicine. In this review, we mainly reviewed the history and current study development of ovarian germline stem cells in postnatal female mammals.

Key words: ovary; germline cells; stem cells; oocyte reproduction

1951年至今, 人们普遍认为哺乳动物出生后卵巢内卵子数目一定不会再生^[1]。女性一生只有400~500个卵子成熟排出, 随着卵泡耗竭, 卵巢萎缩, 女性渐渐由育龄期转入绝经期^[2]。然而, 近来研究发现, 新生小鼠及成年小鼠体内可能含有再生卵子的细胞, 随后在女性育龄期、绝经期以及卵巢早衰患者体内也得到验证, 并将此类细胞命名为女性生殖干细胞 FGSCs (female germline stem cells, FGSCs) 或卵巢干细胞 OSCs (oogonial stem cells, OSCs)^[3-8]。这一概念的提出是对经典理论的挑战, 引起了激烈争论^[9-12]。FGSC的进一步研究, 有可能对卵子的生成、绝经的发生等基础研究及临床不孕治疗带来深远影响。本文对卵巢生殖干细胞的发现、近期研

究、存在的问题及前景展望等方面进行简要综述。

1 哺乳动物出生后卵子停止再生经典理论的提出

早期关于哺乳动物出生后卵子再生问题的讨论, 主要包括两种观点: 一是哺乳动物出生后卵巢内卵子数目一定, 随着年龄增长而减少^[13]; 另一个

收稿日期: 2015-06-16; 修回日期: 2015-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81471520); 国家留学基金项目(2011911033); 北京市自然科学基金项目(5122015); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养项目(2014-3-075)

*通信作者: E-mail: yingliubj@hotmail.com

是卵巢生殖上皮可以再生卵子^[14]。而“哺乳动物出生后卵子停止再生”这一经典理论的确立是在1951年, Zuckerman^[1]研究了1900-1950年期间几乎所有可搜集到的相关文献, 并未发现充分证据证明出生后卵子能够再生, 也不能证明卵巢生发上皮含有生殖干细胞。当时对小鼠、恒河猴、兔子、狗以及人等多个物种的研究均提示出生后卵巢内的卵子数目下降^[1]。有研究使用X线照射来清除卵巢内的卵子, 避免照射生发上皮, 结果并无充分证据证明有干细胞来源的卵子的再生^[15]。由此, Zuckerman认为, 哺乳动物出生后卵巢内无卵子再生。

2 FGSC概念的提出

FGSC是指来源于卵巢组织, 表达生殖系标志物, 并能够进行有丝分裂, 且具有增殖能力的生殖细胞。FGSC的概念最早是在2004年提出。当时Johnson等^[3]在研究小鼠卵子凋亡, 比较闭锁卵泡和未闭锁卵泡数目时, 发现卵泡闭锁速率虽然开始很低, 但在出生后第30天时迅速增高, 在第42天达到峰值。如果卵泡以这样的速率闭锁, 那么卵泡储备会在几周之内耗竭。然而, 小鼠在出生12个月以后依然存在始基卵泡和早期生长卵泡。考虑可能存在卵子再生来补充丢失的卵泡。

他们对出生后小鼠的卵巢进行免疫组化染色, 用生殖细胞特异性标志物MVH(mouse vasa homologue, MVH)进行标记, 结果显示MVH阳性的细胞具有与生殖细胞相似的表型, 同时表达联合复合体蛋白SCP3(synaptonemal complex protein 3, SCP3), 该蛋白在进化过程中高度保守, 被认为是进入减数分裂的标志物^[16]。将野生型成年小鼠的部分卵巢组织移植到绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)阳性的转基因小鼠体内, 3~4周之后, 手术移除卵巢, 利用共聚焦显微镜进行分析, 发现GFP阳性的卵子被包裹在野生型小鼠卵巢的卵泡里, 表明GFP阳性细胞可利用野生型小鼠的细胞诱发卵泡再生, 从而提出在出生后的小鼠卵巢内有可能存在卵巢生殖干细胞再生卵子^[3]。

3 FGSC的质疑与争论

哺乳动物出生后FGSCs存在的观点与传统观点截然不同, 一经提出即引起激烈讨论。有学者质疑Johnson等关于卵泡闭锁率的计算问题, 他们认为其卵泡计数方法有相当的主观性, 据此评估卵泡闭锁并不可靠, 并且标本的固定方法粗糙, 容易导

致正常的卵泡发生形变, 误认为是闭锁卵泡^[9]。有学者记录出生后6天到1年的小鼠的卵泡丢失数目, 通过数学建模来探讨卵子再生情况, 发现只有假定卵泡数固定的方程才能准确反映观察到的卵泡数变化情况^[17]。

在对人类卵巢的研究中, 有学者通过分析其中是否存在与卵子再生相关的减数分裂蛋白, 来探讨出生后是否存在卵子再生。同样, 他们并未发现卵巢组织表达与卵子形成相关的减数分裂特异性标志物, 而作为阳性对照的胚胎期卵巢和睾丸组织则均为阳性表达。他们进一步验证了卵原细胞标志物OCT3/4、c-kit和细胞周期进展标志物Ki-67、PCNA等, 亦未获得阳性结果^[18]。随后, 对人胚胎时期及成年期卵巢进行免疫组化研究也认为出生后2a内卵原细胞逐渐减少, 出生2a后卵巢内未发现卵原细胞标志物c-kit、SSEA-4、Nanog、Oct-4^[19]。

Ddx4(DEAD box polypeptide 4, Ddx4), 即MVH, 是目前较为公认的生殖细胞标志物^[20]。Zhang等^[21]通过对转基因小鼠进行杂交, 使Ddx4基因的启动子一旦被激活, 即能同时表达红色荧光基因, 从而在小鼠体内和体外跟踪生殖细胞的发展过程, 但结果发现新生鼠的Ddx4阳性细胞没有进入有丝分裂, 也没有生成卵子。Zhang等^[22]通过Sohlh1-CreER^{T2}、R26R与Foxl2-CreER^{T2}、mT/mG 3种转基因小鼠模型, 进行体内示踪卵母细胞和卵泡, 发现在小鼠卵母细胞生成中没有GSCs的作用, 生命早期形成的卵母细胞初始池是整个生育期生殖细胞的唯一来源。2013年, Lei和Spradling^[23], 以及Yuan等^[24]对成年小鼠、猴子、人的卵巢组织进行研究, 均未发现有增殖能力的生殖干细胞存在。

虽然以上实验结果对卵巢生殖干细胞的存在提出质疑, 但是仍有实验表明, 哺乳动物出生后体内有可能存在卵巢生殖干细胞。

4 FGSC存在的证据

早在2005年, Bukovsky等^[25]对3例卵巢早衰患者进行研究, 取部分卵巢表面组织, 在有雌激素活性的培养基中培养, 成功获得卵泡样结构, 有2例患者体外受精后可见胚胎样结构, 发育成囊胚, 冷冻保存。

囿于伦理的限制, 在随后的10年里, 基本没有关于人卵巢生殖干细胞的相关临床实验; 但是对于小鼠卵巢生殖干细胞的研究却给FGSC的存在提供了有力证据。

2009年, Zou等^[4]将从卵巢分离出的生殖干细胞注射到不孕小鼠体内成功获得后代。他们采用免疫磁珠法, 从新生小鼠和成年小鼠卵巢内分离出MVH阳性细胞, 通过BrdU来证实MVH阳性细胞的增殖能力。免疫组化显示, 大多数MVH和BrdU双阳性细胞分布在卵巢表面上皮(ovarian surface epithelium, OSE)。体外培养这些细胞可以形成集落, 多次传代后MVH仍稳定表达, 核型正常, 表达生殖细胞标志物Oct-4、Mvh、Dazl、Blimp-1、Fragilis、Stella和Rex-1, 具有较高的端粒酶活性。

虽然也有学者认为, 这些研究对象多为出生数日内的新生小鼠, 而成年小鼠研究较少。为了进一步验证卵巢生殖干细胞存在并具有正常功能, Zou等^[4]分别将从新生小鼠卵巢获得的nGSC(neonate GSC)和成年小鼠卵巢的aGSC(adult GSC)转染GFP并移植到化疗后的不孕小鼠体内, 饲养75~110d后自然交配。结果显示, 82%的nGSC和80%的aGSC移植小鼠可产生正常后代, 子代中分别有26.8%和28.2%含有GFP基因。因此, 证实卵巢内含有FGSC, 可在体外长期培养, 并且能够发展成为成熟的具有受精能力的卵子, 产生后代。他们在随后的研究中发现并证实了另一个卵巢生殖干细胞的标记物Fragilis, 筛选出来的细胞同样可以体外长期培养, 并产生后代^[26-27]。除此之外, 对成年小鼠的研究同样证实, 卵巢内存在表达生殖细胞标志物和减数分裂标志物的生殖干细胞^[28-30]。

在关于人类卵巢的研究中, Virant-Klun等^[5]将绝经后女性卵巢表面上皮体外培养, 获得卵子, 孤雌激活得到胚胎样结构, 由此推断, 衰老女性卵巢内依然存在卵巢生殖干细胞。Virant-Klun等^[31]还对3例卵巢早衰患者进行研究, 年龄分别为21岁、30岁、42岁, 于卵巢组织体外培养的第4d可见细胞集落形成, 第10d可见小圆形卵子样细胞贴附在皿底成纤维细胞上。多数细胞集落表达碱性磷酸酶、Sox-2和SSEA-4, 卵子样细胞表达多种多能标志物。Woods和Tilly^[20]也从40多岁和50多岁女性卵巢内成功分离出卵巢生殖干细胞。

2012年, White等^[32]取22~33岁要求行变性手术患者的卵巢组织体外培养, 流式分选出Ddx4阳性的细胞, 体外培养获得卵细胞样的结构, 可以连续扩增数月, 并且表达卵细胞标志物及减数分裂相关标志物。Woods和Tilly^[20]通过慢病毒转染人卵巢生殖干细胞使其表达GFP, 之后注射到人类卵巢皮质内, 再将人卵巢皮质移植到免疫缺陷雌性小

鼠体内, 1~2周后可观察到GFP阳性卵子。

而对于FGSCs的质疑, Bukovsky等^[33]认为Johnson等^[34]未能在成年女性卵巢内找到卵巢生殖干细胞存在的证据可能与取材时期有关。胚胎时期的卵子再生是连续的, 而成年时期, 只有在排卵后才会开始卵子再生过程, Imudia等^[35]也发现卵巢生殖干细胞数在黄体期达高峰。而Johnson等^[34]并未提及获取标本时的月经期别, 也无足够放大倍数的免疫组化照片来判定相关标志物的表达。

Park等^[7]重复了Zhang等^[21]的实验, 发现确实存在表达红色荧光蛋白的细胞, 随后将小鼠卵巢细胞通过FACS分选, 发现有一小部分表达红色荧光基因的细胞同时表达Ddx4蛋白, 体外培养具有增殖能力, 表达原始生殖细胞标记物, 而另一部分细胞可能由于Ddx4启动子的漏洞, 只表达红色荧光, 但并不属于生殖细胞系, 因此, 体外无增殖活性。

同时, 也有报道发现其他成年哺乳动物, 如猴子、牛、猪、羊等卵巢内存在生殖干细胞^[30, 36]。

因此, 可以认为哺乳动物出生后卵巢内有可能存在生殖干细胞。之所以目前FGSC研究结果不一致, 可能是研究的对象不同、取材的时期不同, 以及检测的方法不同等原因导致。

5 FGSC未解决的问题

目前, 卵巢生殖干细胞的研究还处在初级阶段, 许多问题有待阐明。比如, 既然同育龄期女性一样, 绝经后女性卵巢内也存在生殖干细胞, 那么为什么不能再生卵子; 如果衰老的卵巢内生殖干细胞处于休眠状态, 那么在什么条件下可以被激活。这些问题目前还没有明确的答案。

生殖细胞的分化发生在胚胎发育早期, 而颗粒细胞和始基卵泡在中孕期才出现^[37]。Bukovsky^[38]认为, 由于组织器官在胚胎发生过程中出现时间的早晚与其功能维持时间的长短密切相关, 所以, Bukovsky和Caudle^[37]认为很可能是由于围绝经期颗粒细胞生成减少, 始基卵泡形成受限, 卵巢失去排卵功能, 从而导致绝经。同时, Niikura等^[39]对衰老小鼠的研究发现, 在其萎缩的卵巢内可能存在休眠的卵巢生殖干细胞, 当暴露于年轻成年小鼠的卵巢内环境时, 能够观察到卵子再生。可见, 干细胞的内环境对其功能有一定影响, 从遗传学方面讲, 适时绝经有可能避免将衰老卵子积累的不良遗传改变传递给后代^[40]。

在体外培养时, 如何建立并完善卵巢生殖干细

胞的培养与分化体系,使获得的卵子体外发育成熟,具有受精能力并且能发育成正常胚胎,以及卵巢生殖干细胞内环境的改善是否可以阻止或逆转其功能下降,维持月经等都是值得探讨的问题^[40]。

6 FGSC的前景

虽然卵巢生殖干细胞的研究尚不成熟,但是其潜在临床应用价值已经逐渐被人们意识到^[6,41]。对于卵巢早衰的不孕患者,传统的方法是接受赠卵。患有恶性肿瘤需手术或者辅助放化疗的年轻女性,为避免生育功能受到药物射线损伤,可进行卵巢组织冻存。而卵巢生殖干细胞的研究一旦成熟,便可以以为这些患者提供另一种方法实现妊娠。

Terraciano等^[42]将GFP阳性的脂肪干细胞、GFP与MVH双阳性的卵巢生殖干细胞、卵巢细胞悬液分别显微注射入化疗后小鼠卵巢内,7d后处死小鼠,发现3种细胞治疗均能增加卵巢内卵泡数目,并且卵泡形态正常。提示干细胞移植有可能改善化疗后小鼠的卵巢功能。

Hayashi等^[43]已经成功诱导小鼠胚胎干细胞和iPS(induced pluripotency stem cell, iPSC)细胞为雌性原始生殖细胞样细胞,移植回小鼠体内卵巢后产生后代。这为卵巢生殖干细胞的研究和临床应用提供了经验。

卵巢生殖干细胞最终应用于临床,还需要通过IVG和IVM的方法将其培养为具有受精能力的成熟卵子,进而形成胚胎^[44]。Gura等^[45]正在进行相关实验,该技术的成熟及应用有望避免一系列超促排卵药物的应用及其并发症,使体内激素水平更接近生理状态,有可能带来更高的临床妊娠率,在患者依从性上以及经济上都具有一定优越性^[44]。

除此之外,Baas^[46]将FGSC来源的卵子线粒体移植到IVF手术患者自身的卵子中,通过改善线粒体供能提高卵子质量,获得尽可能高的IVF成功率,同时可避免使用赠卵的线粒体。2015年,《新科学家》杂志报道,Coghlan^[47]通过注射卵巢干细胞来源的线粒体以提高卵子质量,最终获得IVF婴儿出生,被称为第一例干细胞婴儿。2015年还将开展将卵子的前体细胞移植入患者卵巢,以改善卵巢储备。

总之,关于卵巢生殖干细胞的存在仍然有许多质疑,即使认为存在的学者,也未能证实其能够发育为功能正常的卵子^[44]。但不可否认,在这些质疑声中,卵巢生殖干细胞的研究正在逐渐深入。

[参 考 文 献]

- [1] Zuckerman S. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res*, 1951, 6: 63-108
- [2] 谢幸, 苟文丽(主编). 妇产科学[M]. 8版. 北京:人民卫生出版社, 2013: 15-6
- [3] Johnson J, Canning J, Kaneko T, et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 2004, 428: 145-50
- [4] Zou K, Yuan Z, Yang Z, et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 631-6
- [5] Virant-Klun I, Rozman P, Cvjeticanin B, et al. Parthenogenetic embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes. *Stem Cell Dev*, 2009, 18: 137-49
- [6] Woods DC, White YA, Tilly JL. Purification of oogonial stem cells from adult mouse and human ovaries: an assessment of the literature and a view toward the future. *Reprod Sci*, 2013, 20: 7-15
- [7] Park ES, Tilly JL. Use of DEAD-box polypeptide-4 (Ddx4) gene promoter-driven fluorescent reporter mice to identify mitotically active germ cells in post-natal mouse ovaries. *Mol Hum Reprod*, 2015, 21: 58-65
- [8] Virant-Klun I, Zech N, Rozman P, et al. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation*, 2008, 76: 843-56
- [9] Gosden RG. Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis? *Hum Reprod Update*, 2004, 10: 193-5
- [10] Greenfeld C, Flaws JA. Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. *Bioessays*, 2004, 26: 829-32
- [11] Telfer EE, Gosden RG, Byskov AG, et al. On regenerating the ovary and generating controversy. *Cell*, 2005, 122: 821-2
- [12] Eggan K, Jurga S, Gosden R, et al. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*, 2006, 441: 1109-14
- [13] Pearl R, Schoppe WE. Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl. *Exp Zool*, 1921, 34: 101-18
- [14] Kingery HM. Oogenesis in the white mouse. *J Morphol*, 1917, 30: 261-315
- [15] Hanna CB, Hennebold JD. Ovarian germline stem cells: an unlimited source of oocytes? *Fertil Steril*, 2014, 101: 20-30
- [16] McKee BD. Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1677: 165-80
- [17] Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, et al. Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev Biol*, 2006, 298: 149-54
- [18] Liu Y, Wu C, Lyu Q, et al. Germline stem cells and neo-

- oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol*, 2007, 306: 112-20
- [19] Byskov AG, Hoyer PE, Yding AC, et al. No evidence for the presence of oogonia in the human ovary after their final clearance during the first two years of life. *Hum Reprod*, 2011, 26: 2129-39
- [20] Woods DC, Tilly JL. Isolation, characterization and propagation of mitotically active germ cells from adult mouse and human ovaries. *Nat Protoc*, 2013, 8: 966-88
- [21] Zhang H, Zheng W, Shen Y, et al. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 12580-5
- [22] Zhang H, Liu I, Li X, et al. Life-long *in vivo* cell-lineage tracing shows that no oogenesis originates from putative germline stem cells in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 17983-8
- [23] Lei L, Spradling AC. Female mice lack adult germ-line stem cells but sustain oogenesis using stable primordial follicles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 8585-90
- [24] Yuan J, Zhang D, Wang L, et al. No evidence for neo-oogenesis may link to ovarian senescence in adult monkey. *Stem Cells*, 2013, 31: 2538-50
- [25] Bukovsky A, Gupta SK, Virant-Klun I, et al. Study origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human and rat ovaries. *Methods Mol Biol*, 2008, 450: 233-65
- [26] Zou K, Hou L, Sun K, et al. Improved efficiency of female germline stem cell purification using fragilis-based magnetic bead sorting. *Stem Cells Dev*, 2011, 20: 2197-204
- [27] Zhou L, Wang L, Kang JX, et al. Production of fat-1 transgenic rats using a post-natal female germline stem cell line. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20: 271-81
- [28] Zhang D, Fouad H, Zoma WD, et al. Expression of stem and germ cell markers within nonfollicle structures in adult mouse ovary. *Reprod Sci*, 2008, 15: 139-46
- [29] Pacchiarotti J, Maki C, Ramos T, et al. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation*, 2010, 79: 159-70
- [30] Parte S, Bhartiya D, Telang J, et al. Detection, characterization, and spontaneous differentiation *in vitro* of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. *Stem Cells Dev*, 2011, 20: 1451-64
- [31] Virant-Klun I, Skutella T, Stimpfel M, et al. Ovarian surface epithelium in patients with severe ovarian infertility: a potential source of cells expressing markers of pluripotent/multipotent stem cells. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 381928
- [32] White YA, Woods DC, Takai Y, et al. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med*, 2012, 18: 413-21
- [33] Bukovsky A, Caudle MR, Gupta SK, et al. Mammalian neo-oogenesis and expression of meiosis-specific protein SCP3 in adult human and monkey ovaries. *Cell Cycle*, 2008, 7: 683-6
- [34] Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, 2005, 122: 303-15
- [35] Imudia AN, Wang N, Tanaka Y, et al. Comparative gene expression profiling of adult mouse ovary-derived oogonial stem cells supports a distinct cellular identity. *Fertil Steril*, 2013, 100: 1451-8
- [36] Song SH, Kumar BM, Kang EJ, et al. Characterization of porcine multipotent stem/stromal cells derived from skin, adipose, and ovarian tissues and their differentiation *in vitro* into putative oocyte-like cells. *Stem Cells Dev*, 2011, 20: 1359-70
- [37] Bukovsky A, Caudle MR. Immunoregulation of follicular renewal, selection, POF, and menopause *in vivo*, vs. neo-oogenesis *in vitro*, POF and ovarian infertility treatment, and a clinical trial. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012, 10: 97
- [38] Bukovsky A. Immune maintenance of self in morphostasis of distinct tissues, tumour growth and regenerative medicine. *Scand J Immunol*, 2011, 73: 159-89
- [39] Niikura Y, Niikura T, Tilly JL. Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Aging: Albany NY*, 2009, 1: 971-8
- [40] Hosni W, Bastu E. Ovarian stem cells and aging. *Climacteric*, 2012, 15: 125-32
- [41] Woods DC, Tilly JL. The next (re)generation of ovarian biology and fertility in women: is current science tomorrow's practice? *Fertil Steril*, 2012, 98: 3-10
- [42] Terraciano P, Garcez T, Ayres L, et al. Cell therapy for chemically induced ovarian failure in mice. *Stem Cells Int*, 2014, 2014: 720753
- [43] Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, et al. Offspring from oocytes derived from *in vitro* primordial germ cell-like cells in mice. *Science*, 2012, 338: 971-5
- [44] Gosden RG. Programmes and prospects for ovotechnology. *Reprod Biomed Online*, 2013, 27: 702-9
- [45] Gura T. Reproductive biology: Fertile mind. *Nature*, 2012, 491: 318-20
- [46] Baas T. Repowering the ovary. *SciBX*, 2012, 5: 4-6
- [47] Coghlan A. First baby born with IVF that uses stem cells to pep up old eggs. *New Scientist*, 2015