

DOI: 10.13376/j.cblls/2017001

文章编号: 1004-0374(2017)01-0001-07

· 专题: 生殖生物学 ·



夏国良, 博士、教授、教育部长江学者特聘教授、国家杰出青年基金获得者、宝钢优秀教师获得者、“973”首席科学家、北京市优秀教育工作者。1991–1994年在丹麦国家教学研究医院生殖生物学实验室做博士后, 师从国际著名胚胎学家 Anne Grete Byskov 教授, 从事胚胎卵巢中卵细胞的发育和调节的研究。回国后继续从事哺乳动物卵泡发育和卵母细胞成熟机理的研究。发表学术论文 100 余篇。其中在国际著名杂志 *Science*、*Nature*、*Development*、*JBC*、*JCS* 等发表 SCI 论文 60 余篇。合作主编国内第一部《生殖生物学》专著。承担包括国家杰出青年基金、长江学者特聘教授配套基金、“973”及国家重大基础研究计划课题、国家自然科学基金、北京市自然科学基金等项目多项。现任中国畜牧兽医学学会动物生理生化学会理事长、中国生殖生物学会副理事长、中科院动物所生殖生物学国家重点实验室学术委员会委员、内蒙古大学哺乳动物胚胎工程及生物技术教育部重点实验室学术委员会委员等。

女性卵巢功能基础研究与国人生殖健康

王 超, 夏国良*

(中国农业大学生物学院, 北京 100193)

摘 要: 生殖健康事关人口健康。在育龄女性卵巢中, 原始卵泡的形成、始动募集和周期性募集等生理过程不仅是其生育能力的长短和质量的决定因素, 也是诱发卵巢功能障碍、不孕不育和卵巢疾病的几个主要环节。遗憾的是, 目前尚未充分认识其生理机制, 而近年来的调查显示, 我国生殖健康状况不容乐观。因此, 拟通过对现阶段相关基础研究的剖析, 探讨加强卵巢功能调控研究, 尤其是促进卵泡发育和周期性募集的细胞与分子调控机理研究的必要性。结合自己的研究, 对今后的研究方向提出了一些建议, 希望能为促进我国生殖领域基础研究起到抛砖引玉的作用。

关键词: 卵巢; 生殖健康; 质量; 资源; 辅助生殖

中图分类号: R339.2*2 **文献标志码:** A

The relation of basic research of female ovarian function to the human reproduction health in China

WANG Chao, XIA Guo-Liang*

(College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Reproductive health is related to the health of the population. In the ovaries of women at childbearing age, the formation of primordial follicles, initiating the recruitment and periodic recruitment and other physiological processes not only determine the length and quality of the fertility, but are also the pivotal points that may induce

收稿日期: 2016-01-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2013CB945500, 2014CB943202, 2014CB138503)

*通信作者: E-mail: glxia@cau.edu.cn

ovarian dysfunction, infertility and ovarian diseases. Unfortunately, we have not yet fully understood the physiological mechanism of reproduction so far. Recent investigation shows that the general reproductive health status is not optimistic in China. Therefore, in this paper, based on the analysis of the current basic researches of reproduction, the authors present their opinions on strengthening the studies upon the regulation of ovarian function, especially the necessity of promoting the study of cellular and molecular level of follicular development as well as periodic recruitment regulation mechanism. Based on our own researches, some suggestions for the future researches are given. We hope that our suggestions may be helpful to promote the reproductive basic research in China.

Key words: ovary; reproduction health; quality; resource; assisted reproductive technology

“提高生殖健康水平，改善出生人口素质”是我国中长期科学和技术发展规划纲要(2006—2020年)的主题之一，也是我国人口健康战略的核心内容。随着我国社会经济的快速发展，环境的恶化、女性职业化和社会化程度的增加以及晚婚晚育比例的升高，产生了大量新的生殖健康问题。据2010年中国不孕不育高峰论坛公布的调查报告，我国目前的人口生殖健康水平不容乐观，近10年来，我国育龄人群的不孕不育率已由3%~5%上升至15%~20%，呈年轻化和女性居多的特点^[1-2]。如果按自发流产率占全部妊娠的约10%~15%计算，2011年我国就有160万~250万女性忍受着自发流产的折磨。在女性，卵巢早衰(premature ovary failure, POF)、多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)、幼稚性卵巢及卵巢肿瘤等疾病占女性不孕病因的近50%左右。比如，40岁以下妇女患有POF的约1%~3%，患有PCOS的约4%~7%，而50%的PCOS患者生育力下降^[3]。再以POF为例，它不仅可能导致女性不育，还会提高心脑血管疾病和乳腺癌等重大疾病的易感性^[2,4]。从社会学角度讲，因人口老龄化和妇女绝经年龄普遍提前而引起的更年期综合征问题已由简单的家庭问题逐步演变为社会问题^[5-6]。因此，应长期重视和研究如何解决妇女生殖疾病的问题。与此同时，随着近20年来癌症治疗水平的提高，患者的存活期普遍延长，其中育龄期女性患者对于保存其生育能力的需求也在急剧增加。以美国2008年的统计数据为例，有约25万(占总育龄期女性癌症患者的56%)处于20~39岁的患者普遍要求在癌症治疗前保留其生育能力^[7]。因此，通过前瞻性研究，研发相应的保留女性生育能力的措施也显得日益紧迫和重要。

综合来看，女性不孕与妇女卵巢(ovary)中卵泡(follicle)发育异常，不能产生正常的卵母细胞

(oocyte)和分泌符合生理规律的生殖激素等因素直接相关。研究卵泡发育不仅仅是揭示生殖奥秘的学术需要，更是我国当前人口健康战略的迫切需求。

1 卵巢的结构与功能基础

卵泡是女性卵巢结构和功能的基本单位，也为卵母细胞成熟和生殖激素的产生提供了微环境。一般认为，哺乳动物(包括人)的原始卵泡(primordial follicle)在出生前后形成，之后不再增加。卵巢中的原始卵泡，只有约1/10~1/3能被激活而开始生长形成初级卵泡(primary follicle)，这一过程被称为原始卵泡始动募集(initial recruitment)。而在初级卵泡中，只有部分能在激素等调控下继续发育，经历次级卵泡(secondary follicle)和有腔卵泡(antral follicle)阶段，最后形成成熟卵泡(dominant Graffian follicle)并排出卵子，这些过程在性成熟后的动物卵巢中周期性地发生，因此被称为卵泡的周期性募集(cyclic recruitment)。当卵巢内原始卵泡随年龄增长耗尽之后，雌性哺乳动物即失去生殖能力^[8-10]。可见，卵泡形成和募集生长的正常与否将直接决定动物(包括人)的生殖能力。

此外，有腔卵泡的膜细胞和颗粒细胞可合成并分泌类固醇激素，如孕酮(progesterone)、雄激素(androgen)和雌激素(estrogen)，而这些激素则是维持女性第二性征(声带变细和乳房发育等)和妊娠所必需的。更值得关注的是，卵泡的形成和发育也是卵巢相关疾病发生的主要阶段。研究发现，炎症、代谢紊乱、自身免疫和应激等各种体内外因素都可能干扰和破坏卵泡始动募集和周期性募集，导致卵泡和卵母细胞发育异常，比如POF和PCOS，从而导致不孕不育、自发流产和新生儿缺陷等疾病^[11-13]。

2 问题与对策

2.1 开辟原始卵泡资源,服务于辅助生殖医学临床

2.1.1 临床紧缺大量可用的卵母细胞资源

目前,国内临床将冷冻技术(包括卵巢组织、卵母细胞和胚胎)与试管婴儿等辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)相结合,解决了部分患者的生育问题,但所能达到的效率普遍较低,如《2010中国不孕不育现状调研报告》显示,ART的平均成功率不到40%。

造成ART成功率低的原因是多方面的。如果从卵母细胞的来源分析,由于ART所需大量卵母细胞都是通过使用促性腺素与促性腺激素释放激素的激动剂或拮抗剂做超数排卵处理实现的,而利用这种技术获得的卵母细胞的数量和质量不好控制可能是ART成功率低的首要原因^[14-17]。比如,国际上至今尚无统一的促性腺激素注射的浓度标准,不同个体因为对FSH的敏感阈值差异,往往使用相同剂量可能会导致部分患者出现卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)^[18];其次,利用超排获得的卵母细胞依赖于卵巢中正常发育的大的有腔卵泡,因此对于那些卵巢功能受损患者,因其自身无法自然产生卵母细胞,或产生的卵母细胞质量低下,通过超排往往成功率极低^[19-21];再有,对于患有POF等卵泡发育异常的青春前期患者则无法使用该技术^[22]。因此,开辟新的卵母细胞资源是解决临床所需卵母细胞来源不足的途径之一。

2.1.2 原始卵泡是最佳的卵母细胞来源

人类在出生时,每个卵巢含有约40万~50万个卵泡,这些卵泡绝大多数都停留在原始卵泡阶段。在生殖周期中,它们经过始动募集和周期性募集发育至成熟并排卵,但在更年期之前每个妇女所排卵的数量非常有限,其他均在逐次周期性募集过程中凋亡了。当卵巢中原始卵泡的数目低于1000个时,卵巢的排卵活动基本停止,女性也就步入了更年期。可见,原始卵泡组成的卵泡库就是女性生殖资源的储备库,其始动募集的比例正常与否将直接影响到原始卵泡库消耗的速度、女性的生育能力以及生育期的长短。

新近研究显示,开发人类卵巢中大量的原始卵泡不仅有助于解决临床所需成熟卵母细胞不足的问题^[23],更为重要的是,临床发现对于患有癌症的女童和育龄期妇女,冷冻卵巢组织是保留其生育能力的重要途径^[24-26]。而经解冻后的卵巢组织中原始卵

泡的发育能力要比初级及以后卵泡的发育能力都强,原始卵泡的存活率可高达80%^[27-29],这充分说明了研究原始卵泡发育的重要意义。同时,干细胞领域的快速发展为体外诱导形成雌性生殖细胞奠定了重要基础,以此为途径产生成熟卵母细胞也成为大众的期望^[30-31]。然而,在体外如何让原始生殖细胞发育成为有功能的卵母细胞并成功地应用于临床,尚面临重大的技术障碍。要越过这个障碍也离不开对原始卵泡形成机制(包括卵母细胞减数分裂)的基础研究。因此,研究原始卵泡的形成和激活的分子机制,不仅有利于从理论上明确引起大量卵母细胞程序性死亡和卵泡闭锁的原因,也有助于控制卵巢组织体外培养过程中能发育的原始卵泡的数量和质量。

2.1.3 研究和开发原始卵泡的体外培养模型的紧迫性

由于缺乏合适的研究模型,目前人们对原始卵泡形成的了解还很少,研究结果也很零散,无法对卵泡形成的细胞和分子调节有一个较完整的理解。虽然已经有了从小鼠实验中获得了冷冻卵巢组织经体外激活和成熟培养而得到后代的报道^[23,32],但在人类临床仍未见成功。

因此,目前我们急需研究清楚卵原细胞是如何启动减数分裂形成卵母细胞,以及发育到什么阶段的卵母细胞才能和卵巢体细胞互作形成原始卵泡,有哪些分子参与,以及它们如何调节这些过程等等。遗憾的是,这些研究都还处于探索阶段。生理情况下,一部分卵母细胞可以维持在减数分裂前期长达40年,甚至更久,而这个过程的维持与卵泡中的体细胞关系密切,但具体机制是什么至今仍不完全明确。再有,在形成原始卵泡的过程中,大量的卵母细胞凋亡,其生理学意义和分子机制是什么我们也还没有得到确切的回答。这些重要科学问题都是今后一段时间需要解决的重大问题。

2.1.4 筛查与原始卵泡激活相关的关键信号蛋白,为临床应用做好铺垫

原始卵泡作为卵巢内各级卵泡发育的来源,绝大多数必须处于休眠状态以维持卵巢储备。近几年随着基因敲除,尤其是条件性基因敲除小鼠的广泛应用,人们揭示了卵母细胞内PTEN-PI3K-AKT-FOXO3和TSC-mTORC1-S6K1-RPS6信号通路在原始卵泡起始募集中的协同作用^[4]。其中,敲除卵母细胞中PTEN会促进AKT的磷酸化和细胞核外排FOXO3蛋白,进而激活静息状态的原始卵泡^[33]。而无论敲除TSC1还是TSC2,都会激活mTORC1,

提高 S6K1-RPS6 的活性, 从而激活原始卵泡^[34]。新近研究还发现颗粒细胞中 KITL-KIT 信号通路也参与了上述过程: 抑制原始卵泡颗粒细胞中的 mTORC1 信号会阻断颗粒细胞的分化, 导致处于静息状态的卵母细胞最终凋亡。相反, 过度激活颗粒细胞中的 mTORC1 信号会加速颗粒细胞的分化, 导致所有静息状态的卵母细胞和原始卵泡中卵母细胞提前被激活。其分子机制可能是原始卵泡颗粒细胞释放 KIT 配体 (KITL) 信号, 诱导颗粒细胞中 mTORC1-KITL 和卵母细胞中的 KIT-PI3K 信号级联, 最终引起原始卵泡激活^[35]。

基于以上研究成果, 通过应用 PI3K 激活剂所建立的原始卵泡体外激活技术 (*in vitro* activation of primordial follicles, IVA) 于 2013 年成功应用于卵巢早衰症患者并获得世界首例 IVA 婴儿^[36], 这一成就充分证明, 以原始卵泡为资源的体外卵母细胞获得途径是完全可行的, 而且具有非常可观的临床价值。然而, 该技术的安全性仍有待评估并面临成功率较低等问题。今后一段时间内, 应当加强 IVA 技术临床应用的安全性评估和推广研究, 而建立灵长类动物模型则是非常理想的选择。

然而, 由于上述信号通路是调控几乎所有细胞生长发育的主要信号通路, 而且敲除这两个信号通路中的关键基因, 都会导致几乎全部原始卵泡库中原始卵泡的激活, 这与正常生理过程中每次只有很少部分的原始卵泡被激活的情况明显不同。因此, 目前尚不能确定它们是不是正常发育过程中控制卵泡始动募集的关键调控途径。更为重要的是, 人们还没有找到是何种因素调控这两个信号通路从而控制原始卵泡的始动募集。另外, 卵母细胞和卵泡体细胞如何精密协调进而促进原始卵泡始动募集也是目前需要关注的重点之一。

2.2 研究卵母细胞成熟生理机制, 提高卵母细胞体外成熟质量

2.2.1 优化体外培养体系的必要性

研究证明, 仅仅增加卵母细胞的数量远不足以克服 ART 成功率低的问题, 由于 ART 的很多操作都是在体外条件下完成的, 而后者的完善与否直接决定着卵母细胞成熟以及胚胎后续发育能力的高低。

过去 20 年里, 卵母细胞的体外培养 (*in vitro* maturation, IVM) 体系的逐步完善大大增加了可用于临床的卵母细胞的数量, 也为 OHSS 敏感患者, 尤其是 PCOS 患者的生育问题提供了解决途径^[3]。但目前的统计结果显示, 通过 IVM 结合 ART 仅让

几千名 PCOS 患者获得了后代^[37], 其低效率的原因主要是现有 IVM 条件下, 卵泡和卵母细胞的发育能力和质量还远不能与体内相比。

同时, 随着对患癌妇女生育力保留研究的逐步进步, 使得 IVM 体系的应用领域得到了扩展, 即该技术已可用于腔前卵泡发育正常但对 FSH 有抵抗的患者, 以及卵巢组织经冷冻保存的癌症患者^[38]。比如白血病患者, 由于癌症治疗后移植卵巢组织仍存在重新向体内引入癌症细胞的风险, 因此, 卵巢组织冷冻结合 IVM 是目前唯一可行的生育力保留方法。因此, 要进一步提高来自于冷冻或新鲜卵巢组织、体内获取的未成熟卵泡来源卵母细胞经 IVM 诱导成熟卵母细胞的质量和发育潜力, 就要考虑优化体外培养体系, 尤其是要考虑培养的物理条件的改善和在所使用的培养基中添加利于卵母细胞成熟质量提高的生物分子等。

2.2.2 提高卵母细胞体外成熟质量的途径

从生理角度掌握尽可能多的, 与卵母细胞成熟直接相关的细胞生理学和分子生物学基础数据并获得理论突破, 是逐步实现人为干预和促进卵母细胞体外成熟质量的前提。为此, 必须要加大对卵巢生理条件下, 各种来自下丘脑、垂体和卵巢本身所分泌激素和因子促进卵母细胞成熟的生物学研究, 为提高体外培养成熟的卵母细胞的质量提供理论和实验依据。

尽管经过了多年的研究, 我们仍无法对机体如何通过生殖内分泌调控卵母细胞成熟的分子机制给出合理和充分的解释。例如, 体内促性腺激素 (包括 FSH 和 LH) 到底引起了哪些重要活性分子的改变才最终保证了卵母细胞成熟质量? 这些活性分子能否在体外单独或联合使用并达到促进卵母细胞成熟的目的? 我们仍不清楚卵母细胞的质量是否与其存活之间存在正相关性, 我们也不清楚卵泡中颗粒细胞对于卵泡存活的意义所在。另一方面, 也应当加强研究癌症治疗和冷冻对卵子的遗传学和表观遗传学的影响, 以及卵泡发育的分子遗传机制 (包括如何减少印记失效) 的相关研究^[39]。

2.2.3 加强卵母细胞周期性募集的分子机制研究

周期性募集是指在每个发情周期中, 已始动募集的卵泡随促性腺激素分泌的变化, 开始加快生长形成卵泡腔, 最后发育为优势卵泡并排出成熟卵母细胞的过程。尽管这方面的研究已取得了不少成绩, 如我们已经知道促性腺激素是卵泡周期性募集生长的主要调节因子^[40-41], 而且钠肽系统 (BNP

和 CNP)^[42-43] 和胰岛素样生长因子 (AREG 等) 与该过程发生有关^[44-45], 但对它调节卵泡周期性募集的分子机制并不清楚, 对调控颗粒细胞对激素刺激应答的关键过程和参与因子也缺乏了解。

此外, 除了促性腺激素外, 有腔卵泡本身也分泌性激素, 产生大量的自 / 旁分泌因子^[46-47], 至于这些卵泡来源的因子是否也参与卵泡的周期性募集, 迄今尚不清楚。因此, 研究卵泡周期性募集, 阐明卵泡选择的机制就可能为控制卵泡发育和提高卵母细胞成熟质量提供新的思路和靶点。

2.2.4 进一步推动临床IVM体系的研究

2.2.4.1 卵母细胞IVM体系

从 20 世纪 80 年代开始, 通过体外系统促进卵母细胞生长和成熟, 结合辅助生殖技术, 不仅可以用于所有绝经期前妇女经胚胎移植获得后代, 也可以避免某些生殖系统疾病的传播。此外, 卵母细胞的 IVM 体系的优化和发展也为充分利用卵泡和卵巢组织来源的未成熟卵母细胞 (包括冷冻后的) 提供了良好的技术支撑。Cochrane Collaboration 分析认为, 过去 40 年 (1970—2013 年) 的研究结果尚不能确认 IVM 是否优于传统体内促排卵成熟方案, 而要获得明确的结论, 尚需在今后的研究中扩大样本量^[3]。

对于 PCOS 患者, 通过使用超过生理剂量的促性腺素促排卵不仅昂贵, 容易出现多胎, 还往往导致卵巢的过激反应, 导致出现成批的卵泡发育不均一, 排出的卵母细胞不成熟以及 OHSS 出现的风险增加等状况。所获得的卵往往出现受精率低下、卵裂率低下、受孕率和出生率低下等问题。目前解决这些问题的手段是在卵母细胞处于第一次减数分裂前期 (GV 期) 抽取未成熟的卵母细胞, 再经体外成熟培养获得成熟的卵。2013 年, Kim 等^[39] 研究证明, 通过引入褪黑素 (melatonin) 来促进 IVM 及改善临床预后已证明能起到一定作用。

2.2.4.2 卵泡体外培养 (*in vitro* follicle maturation, IFM) 体系

IFM 是研究灵长类卵泡基础生物学, 比如腔前卵泡库的异质性、卵巢甾醇的作用以及卵泡发生过程中的局部因子和卵母细胞发育潜能, 以及冷冻生物学的有力工具^[48]。目前还没有对人类的单个卵泡在体外诱导, 尤其是在化学性限制性培养条件下发育为次级卵泡的报道。这也为我国的女性生殖研究的大发展提供了一个契机。

原始卵泡的体外培养体系建立目前还处于开发

阶段, 目前国外研究领先于我们。比如 2011 和 2012 年, Hornick 及 Telfer 和 Zelinski 等采用三维卵泡培养体系以及多步骤卵泡培养体系就是这方面的很好例证^[49-50]。三维培养体系的发展将有助于通过将灵长类次级卵泡培养为小的有腔卵泡获得成熟卵子。研究显示, 在三维培养条件下, 虽然已经可以实现从体外培养的腔前卵泡中获得健康的卵母细胞, 却很少有卵母细胞从这些卵泡中被取出后, 能发育到自发启动减数分裂阶段, 或者能对促性腺激素 (hCG) 起反应, 因此目前的 IFM 操作体系还有待于进一步改进。

2.2.4.3 解冻后卵巢组织中卵母细胞的体内外培养体系

理论上, 促进卵巢组织中保存的卵母细胞的生长和成熟有三种方案, 包括自体移植 (原位或者异位)、异体移植以及体外成熟培养^[51]。从近两年国外的报道看, 通过原位自体移植解冻的卵巢组织已经成功获得了 20 多例新生儿, 尽管异位移植尚未成功, 但也取得了使得患者的内分泌功能重建长达 7 年的好成绩^[52]。但该方法目前存在的问题是, 移植患者治疗前的组织需要克服移植时的缺血性损伤以及重新植入癌细胞的风险, 这些是否会对后代产生不良后果及其成功率能否提高等尚不清楚。

总的来讲, 要实现 IFM 技术的革新和卵母细胞成熟质量的提高, 一方面需要明确在体外培养条件下参与细胞转录调节的分子的具体作用机制; 另一方面需要找到能够使 IVM 条件得到极大优化的分子或蛋白质。

3 结语

原始卵泡激活进入生长卵泡库、优势卵泡选择以及最终的排卵都需要复杂的内分泌调控和代谢物的相互作用, 也依赖于各种旁分泌因子共同调节颗粒细胞增殖、膜细胞分化和卵母细胞成熟。而全面深入了解卵泡发育与卵母细胞成熟的调控机理, 有助于进一步加深对卵泡发育异常导致的卵巢发育障碍等疾病发生机制的认识, 有助于促进临床上将大量卵巢组织、体内未成熟卵泡及未成熟卵母细胞来源的卵母细胞在体外培养出高质量卵子, 用于 ART 工作的开展, 这些工作终将为我国人口生殖健康做出重要的基础性贡献。

[参 考 文 献]

[1] 吴颖臻, 傅咏南, 方茹. 当前我国生殖健康与出生缺陷

- 的现状分析与思考. 中国优生优育, 2013, 19: 45-9
- [2] Fauser BC, Laven JS, Tarlatzis BC, et al. Sex steroid hormones and reproductive disorders: impact on women's health. *Reprod Sci*, 2011, 18: 702-12
- [3] Siristatidis CS, Vrachnis N, Creatsa M, et al. *In vitro* maturation in subfertile women with polycystic ovarian syndrome undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, (10): CD006606
- [4] Jin M, Yu YQ, Huang HF. An update on primary ovarian insufficiency. *Life Sci*, 2012, 55: 677-86
- [5] 徐红, 肖萍. 更年期妇女的健康问题及社区保健. *社区医学杂志*, 2011, 2: 66-8
- [6] 邓小虹, 张淞文. 北京地区围绝经期妇女健康现状的流行病学调查. *北京医学*, 2002, 4: 235-8
- [7] Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975-2005 [EB/OL]. National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2007, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/
- [8] 杨增明, 孙青元, 夏国良. 生殖生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 73-80
- [9] Broekmans FJ, Knauff EAH, te Velde ER, et al. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab*, 2007, 18: 58-65
- [10] Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, et al. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod*, 2008, 23: 699-708
- [11] Imbar T, Eisenberg I. Regulatory role of microRNAs in ovarian function. *Fertil Steril*, 2014, 101: 1524-30
- [12] Schuster J, Karlsson T, Karlström PO, et al. Down-regulation of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in peripheral nucleated blood cells associated with premature ovarian failure (POF) and polycystic ovary syndrome (PCOS). *Reprod Biol Endocrinol*, 2010, 8: 58
- [13] Ewa LG, Anna P. Endocrine disrupting chemicals: some actions of POPs on female reproduction. *Int J Endocrinol*, 2013, 2013: 828532
- [14] Copperman AB, Benadiva C. Optimal usage of the GnRH antagonists: a review of the literature. *Reprod Biol Endocrinol*, 2013, 11: 20
- [15] Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in *in vitro* fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev*, 2000, (2): CD001299
- [16] Pu D, Wu J, Liu J. Comparisons of GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol in poor ovarian responders undergoing IVF. *Hum Reprod*, 2011, 26: 2742-9
- [17] Sunkara SK, Coomarasamy A, Faris R, et al. Effectiveness of the GnRH agonist long, GnRH agonist short and GnRH antagonist regimens in poor responders undergoing IVF treatment: a three arm randomised controlled trial [C]. London, UK: 29th Annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 2013
- [18] Antonio LM, Sesh KS. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod*, 2014, 20: 124-40
- [19] Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, et al. Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*, 2005, 20: 611-5
- [20] Lekamge DN, Lane M, Gilchrist RB, et al. Increased gonadotrophin stimulation does not improve IVF outcomes in patients with predicted poor ovarian reserve. *J Assist Reprod Genet*, 2008, 25: 515-21
- [21] Berkkanoglu M, Ozgur K. What is the optimum maximal gonadotropin dosage used in microdose flare-up cycles in poor responders? *Fertil Steril*, 2010, 94: 662-5
- [22] Moffa F, Biacchiardi CP, Fagioli F, et al. Ovarian tissue cryostorage and grafting: an option to preserve fertility in pediatric patients with malignancies. *Pediatr Hematol Oncol*, 2007, 24: 29-44
- [23] Eppig JJ, O'Brien MJ. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod*, 1996, 54: 197-207
- [24] Davis VJ. Female gamete preservation. *Cancer*, 2006, 107: 1690-4
- [25] Jeruss JS, Woodruff TK. Preservation of fertility in patients with cancer. *N Engl J Med*, 2009, 360: 902-11
- [26] Kim SS. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertil Steril*, 2006, 85: 1-11
- [27] Huang JY, Tulandi T, Holzer H, et al. Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by *in vitro* maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. *Fertil Steril*, 2008, 89: 567-72
- [28] Amorim CA, Dolmans MM, David A, et al. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertil Steril*, 2012, 98: 1291-8
- [29] Sheikhi M, Hultenby K, Niklasson B, et al. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Hum Reprod*, 2011, 26: 594-603
- [30] 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
- [31] Irie N, Weinberger L, Tang WW, et al. SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell*, 2015, 160: 253-68
- [32] O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod*, 2003, 68: 1682-6
- [33] Li J, Kawamura K, Cheng Y, et al. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 10280-4
- [34] Adhikari D, Gorre N, Risal S, et al. The safe use of a PTEN inhibitor for the activation of dormant mouse primordial follicles and generation of fertilizable eggs. *PLoS One*, 2012, 7: e39034
- [35] Zhang H, Risal S, Gorre N, et al. Somatic cells initiate

- primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Curr Biol*, 2014, 24: 2501-8
- [36] Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 17474-9
- [37] Fadini R, Mignini RM, Dal CM, et al. Oocyte *in vitro* maturation in normo-ovulatory women. *Fertil Steril*, 2013, 99: 1162-9
- [38] Grynberg M, El Hachem H, de Bantel A, et al. *In vitro* maturation of oocytes: uncommon indications. *Fertil Steril*, 2013, 99:1182-8
- [39] Kim SS. Oocyte biology in fertility preservation [M]. New York: Springer, 2013
- [40] Flor S, Johan S. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822: 1896-912
- [41] Conti M, Hsieh M, Zamah AM, et al. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 356: 65-73
- [42] Zhang M, Su YQ, Sugiura K, et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*, 2010, 330: 366-9
- [43] Zhang M, Su YQ, Sugiura K, et al. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes *in vitro*. *Endocrinology*, 2011, 152: 4377-85
- [44] Park JY, Su YQ, Ariga M, et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, 2004, 303: 682-4
- [45] Conti M, Hsieh M, Park JY, et al. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol*, 2006, 20: 715-23
- [46] Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, et al. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, 2008, 135: 111-21
- [47] Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med*, 2009, 27: 32-42
- [48] Jeruss JS, Woodruff TK. Preservation of fertility in patients with cancer. *N Engl J Med*, 2009, 360: 902-11
- [49] Xu M, Fazleabas AT, Shikanov A, et al. *In vitro* oocyte maturation and preantral follicle culture from the luteal-phase baboon ovary produce mature oocytes. *Biol Reprod*, 2011, 84: 689-97
- [50] Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil Steril*, 2013, 99: 1523-33
- [51] Kim SS, Battaglia DE, Soules MR. The future of human ovarian cryopreservation and trans plantation: fertility and beyond. *Fertil Steril*, 2001, 75: 1049-56
- [52] Kim SS. Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29: 489-93