

综述

哺乳动物卵巢卵泡发育调控机制研究进展

张焱, 张华*

中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

摘要: 卵巢作为雌性哺乳动物的性腺, 是由卵母细胞和不同类型的体细胞组成的异质性器官。卵巢在功能上, 一方面担负了与雌性个体健康有关的内分泌调节功能, 另一方面则承载了产生成熟卵母细胞并繁衍子代的重要任务。而承担上述功能的单位为卵泡, 即卵母细胞和卵泡体细胞共同构成的复合体。对于具有较长生殖寿命的哺乳动物而言, 卵泡在卵巢内的发育是一个内部协同与外部调控的精密有序过程。其中后期促性腺激素依赖的有腔卵泡发育直接调控生殖周期的产生, 而近期越来越多的证据表明早期卵泡的有序发育与雌性生殖寿命维持密切相关。因此, 卵泡在体正常发育与雌性个体的健康息息相关; 而深入探索卵泡发育调控机制, 可直接指导我们认识包括人类在内的雌性哺乳动物生殖寿命的维持机制, 并在未来对其进行可能的调控。近年来, 伴随着新技术和新方法的产生, 特别是基因修饰动物的开发以及新型显微技术的出现, 对卵泡发育特别是早期卵泡发育的调控机制研究有了长足的进步。本综述围绕着卵泡在体发育中的关键生理事件, 将近年来对卵泡的生理发育调节机制研究进行梳理, 并重点聚焦于早期卵泡发育的体内相关调控机制研究进展。

关键词: 卵巢; 卵泡; 信号通路; 动物模型; 生殖寿命

中图分类号: Q492.5

Research advances in regulating mechanisms of mammalian ovarian folliculogenesis

ZHANG Yan, ZHANG Hua*

State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: Ovary, the female gonad in mammals, is a heterogeneous organ consisting of oocytes and various types of somatic cells. The functions of ovary is not only governing the health of individual female by regulating endocrine status, but also determining the production of mature oocytes which allow the continuation of species. As the fundamental unit of female reproduction, ovarian follicle consists of germline oocyte and follicle somatic cells, and the folliculogenesis is an accurate and orderly process of internal coordination and external regulation in mammals. The gonadotropin-dependent stage of follicle development, from early antral follicle to ovulation, directly regulates the reproductive cycles of the female, has been extensively investigated. Recently, increased lines of evidence show that the fine tuned early folliculogenesis plays a pivotal role in the maintenance of female reproductive lifespan. Further exploration of the mechanism of follicular development could lead to a more comprehensive understanding about how females maintain their proper reproductive lifespan in mammals, which may provide the possibility to design new therapeutic approaches against female reproductive ageing in future. With the advances of technologies and methods, especially the widespread application of genetically modified animals and novel microscopic technology, the research on regulating mechanisms of *in vivo* follicular development, especially the early stage development of follicles, has made great progress. In this review, we summarized the regulating mechanisms of *in vivo* folliculogenesis around the key developmental events under physiological conditions, with a focus on the research progress of the early development of follicles in recent years.

Key words: ovary; follicles; signaling pathways; animal models; reproductive lifespan

Received 2019-06-27 Accepted 2019-09-24

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFC1003700, 2018YFC1003800, 2017YFC1001100) and the National Natural Science Foundation of China (No. 31571542, 81873815).

*Corresponding author. Tel: +86-10-62734107; E-mail: huazhang@cau.edu.cn

作为雌性哺乳动物性腺的卵巢,是由卵母细胞和不同类型的体细胞组成的异质性器官。卵巢在功能上,一方面担负了与雌性个体有关的内分泌功能,另一方面则承载了产生成熟卵母细胞、繁衍子代的重要任务。而承担上述功能的主要单位,则为卵泡(follicle)。单个卵泡是由位于卵泡中央的卵母细胞以及周围包裹卵母细胞的颗粒细胞和外层的卵泡膜细胞共同构成的复合体。而其中的生殖细胞组分——卵母细胞,发育为成熟的卵子后作为配子产生子代;体细胞组分——颗粒细胞和膜细胞,则分泌激素参与雌性个体的正常内分泌维持。因此,卵泡发育是否正常,不仅仅调控了雌性个体的健康与行为,更为重要的是对子代后续发育具有深远的影响。有趣的是,不同于机体内大部分细胞,卵泡(卵母细胞)的数量在出生前后确定而在成年则不再更新^[1],而后随着年龄增长逐渐有序消耗。卵泡的耗尽导致雌性哺乳动物的生殖衰老,包括人类的绝经^[2,3]。因此,卵泡的形成、激活及发育直接决定了雌性个体的生育力以及生育寿命,而其发育的异常可导致卵巢早衰等女性生殖疾病^[3]。随着通过人为调节后期激素依赖卵泡发育的应用,人类辅助生殖技术在近40年得到了蓬勃的发展;而近年来伴随着早期卵泡发育机制的揭示,新的辅助生殖技术有望得到更加广泛的应用^[4]。

早在约350年前,解剖学家即发现了卵泡结构的存在,著名的格拉芙卵泡也因而得名^[5];而对卵泡结构较为系统的研究,则可追述到百年之前^[6]。1968年, Pedersen 和 Peters 依据卵泡发育过程中的颗粒细胞数量变化,将小鼠卵泡进行了系统的分级^[7]。在此基础上,后续的研究者将卵泡按照其发育阶段,依次分为原始卵泡(primordial follicle)、初级卵泡(primary follicle)、次级卵泡(secondary follicle)、有腔卵泡(antral follicle)和排卵卵泡(ovulated follicle)。实际情况是只有少部分原始卵泡会被招募到生长期。随后部分卵泡可以生长到有腔卵泡阶段,但最终只有个别卵泡会发生排卵,大部分生长卵泡发生闭锁^[3,8]。卵泡发育是一个多细胞参与的,内分泌调控与局部微环境协同调控的复杂在体过程,近年来伴随着基因修饰动物以及相关新技术的发展和应用,对于卵泡发育的生理性调控机制研究有了长足的进步。

在本文中,我们重点关注了近些年卵巢卵泡发育研究的一些重要进展,以在体生理研究为主线,

按照卵泡发育的时序,对哺乳动物卵泡发育相关研究进行了简要的总结(图1),并对近年来应用新技术的一些研究成果和目前存在的一些关键科学问题进行了重点探讨。

1 原始卵泡: 激活与休眠状态的平衡调控

原始卵泡作为卵泡发育的起点和卵泡的储备形式,在雌性生殖的正常维持中具有重要的作用。近年来,卵泡发育研究中的重大突破之一,即是对原始卵泡休眠与激活调控机制的深入认识。事实上,体内原始卵泡具有三种可能的发育命运:(1)保持静息状态,维持雌性生殖寿命的长度;(2)直接从休眠状态死亡;(3)激活后被招募到不断生长的卵泡池中成为生长卵泡,即传统意义上的始动募集(initial recruitment)。而原始卵泡激活(primordial follicle activation)则是原始卵泡发育过程中的核心事件。通过原始卵泡激活调控,雌性动物有序地利用卵巢中的生殖储备,以达到生殖寿命的平衡。原始卵泡库随着年龄增长最终被耗竭,这代表了生殖寿命的终止^[9,10]。因此,卵泡的休眠、死亡和活化之间的平衡是维持生殖寿命所必不可少的。

1.1 原始卵泡的激活调控

在哺乳动物胚胎期,雌性性腺中生殖细胞进入减数分裂并阻滞在减数分裂I的核网期,而后被扁平的前体颗粒细胞(pre-granulosa cells)所包裹形成原始卵泡(临床上常称为始基卵泡)^[11,12]。近年来,利用细胞世系追踪技术,前体颗粒细胞的发育起源得到了一定的阐述。包裹原始卵泡的前体颗粒细胞为FOXL2(forkhead box L2)阳性细胞,但其细胞起源于两群不同的细胞,在小鼠中,一群是在交配后12.5天(day post coitum, dpc)开始表达于胚胎卵巢内的FOXL2阳性细胞^[13];另外一群是卵巢上皮的LGR5(leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor 5)阳性细胞被募集后逐步转换为FOXL2阳性细胞,参与包裹卵母细胞形成原始卵泡^[14]。这群LGR5阳性细胞的发育和募集受到金属蛋白酶ADAM10(a disintegrin and metalloproteinase domain 10)-Notch信号通路的调控^[15]。在原始卵泡库形成后,LGR5阳性细胞只表达于卵巢上皮,作为干细胞负责排卵后卵巢上皮的修复,而FOXL2阳性细胞则将作为颗粒细胞支持卵泡的发育^[16]。

原始卵泡形成之后即处于休眠状态,而后有机会被“唤醒”,随即扁平的前体颗粒细胞开始立方化,

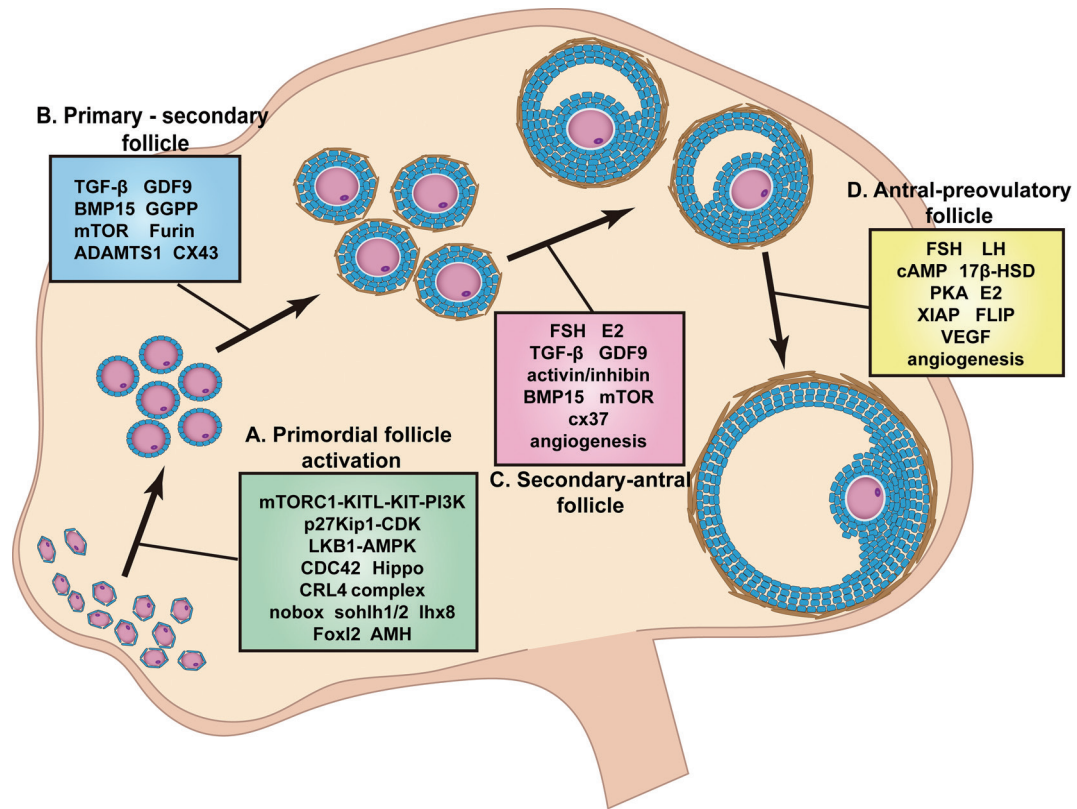


图 1. 卵泡生长发育过程中的调控通路和相关因子

Fig. 1. The signal pathway and key factors of follicular development in the ovary. *A*: In mammalian ovary, only a small proportion of dormant primordial follicles are recruited to growing follicle pool through the process of activation. Several signaling pathways and transcription factors have been shown to play a functional role in controlling follicle activation. *B*: The TGF- β superfamily especially GDF9 in oocyte plays a central role in the early development of follicles from primary to secondary follicles. *C*: The follicles enter to gonadotropin-dependent stage in cyclic recruitment. With increases in circulating follicle-stimulating hormone (FSH), a cohort of secondary follicles grow into antral follicles. *D*: Among this cohort, leading follicles emerge as dominant and form largest preovulatory follicles by secreting high levels of sexual hormones and key factors.

并伴随着卵母细胞快速生长和转录进入活跃的状态，此过程被称为卵泡激活^[17, 18]。利用基因修饰小鼠，特别是条件性敲除小鼠，近年来的研究分别在卵母细胞和前体颗粒细胞中发现了多种信号通路在控制原始卵泡激活方面具有重要作用，包括卵母细胞中的 p27^{Kip1} (p27)-CDK (cyclin dependent kinase) 系统^[19]、PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) 信号通路^[20, 21]、LKB1 (liver kinase B1)-AMPK (AMP-activated protein kinase) 信号通路^[22]、Lhx8 (LIM homeobox protein 8) 信号通路^[23] 和前体颗粒细胞中的 mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1)-KITL (kit ligand)-卵母细胞 KIT-PI3K 信号通路^[17, 21]。而目前认为前体颗粒细胞中的 mTORC1-KITL-卵母细胞 KIT-PI3K 信号通路在原始卵泡的生理性激活过程中发挥了主导的作用^[17, 21]。其中，PTEN (phosphatase

and tensin homologue deleted from chromosome 10) 作为 PI3K 信号通路中的负调控因子对卵泡激活起着“刹车”分子的作用，维持原始卵泡的休眠^[20]。伴随着原始卵泡激活通路的发现，近年来基于原始卵泡激活的全新辅助生殖技术：体外原始卵泡激活 (*in vitro* activation, IVA) 得以进入临床实质应用阶段。尽管目前依然存在着诸多的问题，但相信随着未来研究中新机制的揭示，可期待利用 IVA 技术对目前常规辅助生殖技术无效的人群进行相关治疗。

另外，虽然 PI3K 通路在控制原始卵泡活化方面的核心作用已经被揭示，但对于休眠卵母细胞中调控 PI3K 活性的上游分子目前所知甚少。在 2018 年，Yan 等人发现 Rho GTPase 家族的 CDC42 (cell division cycle 42) 可以通过结合 p110 β (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit

beta) 调控卵母细胞中 *Pten* 的表达进而活化 PI3K 信号通路, 从而激活原始卵泡。此外, CDC42 激活剂可以在体外显著增加成年小鼠卵巢内的原始卵泡激活率, 这表明 CDC42 在临床上可以成为 IVA 全新的潜在激活靶点^[24]。同时, 在原始卵泡发育的过程中, 卵泡外微环境也被认为对其激活有着显著的影响。原始卵泡定位于富含胶原蛋白 (collagen) 的皮质区域, 这里为原始卵泡提供了一个相对刚性的物理环境, 支持卵泡的结构和维持原始卵泡的休眠和存活^[25]。大的有腔卵泡通常也定位于皮质区域, 对周围原始卵泡的激活有一定的抑制作用^[26]。此外, 研究显示卵巢表面受到的机械刺激如划伤等会激活 Hippo 信号通路, 从而促进了原始卵泡的激活和卵泡的生长^[27]。

总之, 原始卵泡的激活是一个十分复杂的过程, 在原始卵泡激活的过程中包含着卵巢内环境和原始卵泡周围微环境、前颗粒细胞的激活与分化和卵母细胞的激活与生长三个方面的互作调控。通过这三个层面的互相调控, 原始卵泡才得以在漫长的生育周期中有序激活, 进而维持了雌性动物正常的生殖寿命。

1.2 原始卵泡的休眠维持

虽然原始卵泡的激活与卵母细胞的后续发育相关, 但对于雌性动物而言, 大部分的原始卵泡维持于休眠状态对于正常的生殖寿命是更为重要的^[3]。无论是原始卵泡的过度激活亦或激活抑制, 均会导致原始卵泡库的大量死亡和提前耗竭, 引起卵巢早衰^[19, 20]。目前研究表明, 原始卵泡休眠的维持受到信号通路和相关转录因子的调控, 同时也与休眠卵泡的卵母细胞和前体颗粒细胞中基因组的稳定性以及表观遗传修饰密切相关。例如 CRL4 复合体 (cullin-ring finger ligase complexes) 可以通过激活 TET 甲基胞嘧啶双加氧酶 (TET methylcytosine dioxygenase), 进而影响原始卵泡休眠相关基因 *Nobox* (NOBOX oogenesis homeobox)^[28]、*Sohlh1/2* (spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1/2)^[29] 和 *Lhx8*^[23] 的甲基化水平, 最终达到调控原始卵泡休眠的目的^[30]。而卵泡体细胞中颗粒细胞特异表达的叉头转录因子 *Foxl2* 对原始卵泡库的维持也具有重要作用^[31]。

此外, 激素和生长因子也参与维持了原始卵泡的休眠, 如抗缪勒氏激素 (anti-Müllerian hormone, AMH)^[32]、血小板生长因子^[33]、以及碱性成纤维细

胞生长因子^[34]等。AMH 是转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β) 超家族的成员之一。在无 AMH 的雌性小鼠中, 原始卵泡库显著减少, 同时生长中的卵泡增多^[32]。同时, 在体外证明施加 AMH 可以明显抑制原始卵泡的激活。这些结果表明 AMH 参与维持了原始卵泡的休眠^[35]。

值得注意的是, Hayashi 研究组通过转录组学分析发现环境因素尤其是低氧环境对于卵母细胞维持休眠状态有重要作用^[36]。但是, 目前对于原始卵泡休眠的维持机制研究还非常不充分, 其内在平衡调控和维持机制还有待于进一步研究。

1.3 原始卵泡的多态性

虽然原始卵泡的形成是一个连续的过程, 同时在形态学上同一物种的原始卵泡大体上也趋于一致, 但近年来利用荧光细胞世系追踪技术在基因修饰小鼠体内追踪实验表明, 卵巢中存在着明显的原始卵泡分群现象, 并且按照其发育速度和生理功能可区分为两波。第一波原始卵泡快速激活发育, 主要贡献于青春期始动和为成年早期提供成熟卵子; 而第二波原始卵泡在形成后长时间维持休眠状态, 并随着年龄增长而缓慢有序地激活, 其贡献于雌性成年后直至更年期之间的漫长生殖时间^[13, 37]。但是两波原始卵泡的形成和激活是否受到不同的分子网络调控有待研究。

2 生长卵泡发育的调控

原始卵泡被激活后, 一般认为随即进入一个不可逆转的生长阶段, 而被激活后的卵泡则被称为生长卵泡 (growing follicle)。大部分生长卵泡发生闭锁, 部分已经发育到小的有腔阶段的卵泡在月经周期初期能在增加的促性腺激素促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 的作用下进入生长的最后阶段, 称为周期募集。这群被周期募集的卵泡在人一般仅有一个被选择成为优势卵泡, 能最后生长成熟, 直至排卵^[3, 8, 38]。因此在卵泡发育中, 事实上大部分卵泡在始动募集和周期募集的过程中发生闭锁和死亡, 真正的“赢家”是极少数的。

2.1 生长卵泡的早期发育特点

原始卵泡激活后发育为具有单层立方状颗粒细胞的初级卵泡, 初级卵泡进一步发育, 颗粒细胞增殖多层化形成次级卵泡。在这个过程中卵母细胞经历了非常快速的生长, 体积增加 100 多倍, 这种大小的剧烈变化反映了 RNA 和蛋白质的快速积累以

及线粒体等细胞器的增加^[39-41]。颗粒细胞在这个过程中则不断地增殖和分化,同时在最外层颗粒细胞周围形成一层基底膜,基底膜外层是包裹卵泡的膜层细胞(theca cells),膜层细胞具有分泌功能,与颗粒细胞共同合成雌激素^[42]。相较于原始卵泡研究,生长卵泡特别是有腔卵泡的研究成果较为丰富,相关的调控机制与分子机理人们认识较深,其核心为促性腺激素调控下的周期募集,其中涉及到卵母细胞-颗粒细胞与膜细胞之间的多分子、多信号通路交互调控。与之相关的综述较为丰富,具体可见 McGee^[3]、Edson^[43]和 Rimón-Dahari^[44]等人的综述,在此不进行赘述。

而生长卵泡发育至有腔卵泡之前,虽然可以响应促性腺激素,但一般认为此阶段的卵泡生长对其并不依赖,而主要受到卵母细胞-颗粒细胞-膜层细胞三者相互协同的调控^[3]。而在此过程中,核心调控则为卵母细胞分泌因子(oocyte secreted factor, OSF)介导的自分泌和旁分泌因子调控。其中 TGF- β 超家族的多个成员均参与了这个过程^[45]。TGF- β 超家族由一群结构保守的蛋白质组成,在各个组织细胞中广泛表达且参与调控了多种生理过程,如细胞增殖、分化、凋亡和细胞迁移^[46]。其成员包括 TGF- β 、骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、生长和分化因子(growth and differentiation factor, GDF)、激活素/抑制素(activin/inhibin)、神经胶质细胞衍生营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)和 AMH 等^[47, 48]均被报道参与调控卵泡的发育过程。TGF- β 家族成员定位于卵泡不同组分中,颗粒细胞表达激活素和 TGF- β ;膜层细胞表达 BMP4、BMP7 和 TGF- β ,卵母细胞表达 GDF9 和 BMP15 等^[49]。在上述旁分泌因子中,卵母细胞特异性分泌的 GDF9 发挥了核心的作用,在卵母细胞与颗粒细胞的互作中起着关键性的调控作用。在 GDF9 缺失的小鼠中,卵泡发育被阻断在初级卵泡阶段^[50],表明了卵母细胞分泌的 GDF9 对于生长卵泡发育有不可替代的调控作用。而近期研究表明,作为 TGF- β 家族成员, GDF9 和 BMP15 具有形成二聚体的特性,其异源二聚体比同源二聚体拥有更高的活性,可更高效地刺激卵泡发育^[51]。除了直接调控颗粒细胞增殖,最近有研究表明,卵母细胞分泌的 GDF9 还可以诱导颗粒细胞产生信号分子 Dhh (Desert hedgehog) 和 Ihh (Indian hedgehog),促进膜层细胞的分化^[52],进一步地体现了 GDF9 在卵泡早期生长过程中的核

心作用。除 GDF9 与 BMP15 之外,近期 Li 研究组发现卵母细胞分泌的 GGPP (geranylgeranyl diphosphate) 可能是另一种重要的 OSF, GGPP 通过诱导卵母细胞内的小 G 蛋白信号通路的激活,进而促进卵母细胞和颗粒细胞之间黏附和信号通讯的建立以及维持,从而调控初级卵泡向次级卵泡的转变^[53]。

在信号通路方面,最近的研究表明卵母细胞中的 mTOR (mammalian target of rapamycin) 信号也参与调控了生长卵泡的发育过程。在原始卵泡中敲除 *Mtor* 会引起卵泡发育的异常,大部分停滞在初级卵泡和早期次级卵泡阶段,甚至会造成颗粒细胞分化为不成熟的雄性支持细胞样细胞(Sertoli-like cell)。若仅在生长卵泡中敲除 *Mtor* 则不仅会影响卵泡的发育,还会造成卵子质量的缺陷和不育的表型^[54]。同时, Sun 等报道 Furin 蛋白作为一种蛋白加工成熟过程中的原蛋白酶家族成员,参与调控卵泡发育过程中金属蛋白酶 ADAMTS1 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs-1) 的加工,卵子缺乏 Furin 蛋白的卵泡,其发育产生明显的早期次级卵泡阻滞现象^[55]。上述结果表明,早期生长卵泡发育调控机制具有高度的复杂性,需要进一步的研究工作加以揭示。

2.2 卵母细胞和颗粒细胞互作的物理基础

在卵泡生长过程中,卵母细胞与颗粒细胞不再紧密相邻,两者之间形成一层由卵母细胞分泌的透明带家族蛋白组成的多糖蛋白胶网状结构。透明带结构或称为卵衣结构(egg coat)十分保守,从无脊椎动物海胆到脊椎动物爪蟾再到哺乳动物的卵子表面均有发现^[56, 57]。透明带随着卵母细胞的生长而增厚,在小鼠卵泡中最终的厚度约为 7 μm ,人类约为 15 μm ^[47, 58, 59]。透明带在卵母细胞和颗粒细胞之间形成物理屏障,阻碍了两种细胞的直接接触和沟通。研究表明,卵母细胞和颗粒细胞之间会形成穿过透明带的微绒毛(microvilli)或称 TZPs (transzonal projections) 的结构,从而使得卵母细胞和颗粒细胞得以进行双向的物质和信号沟通^[43, 60]。颗粒细胞微绒毛顶端通过包括缝隙连接(gap junction)在内的多种形式与卵母细胞完成信号交流^[61, 62]。最近的研究表明卵母细胞分泌的 GDF9 和其他旁分泌因子单独或协同促进颗粒细胞内编码微绒毛关键结构成分[例如 *myosin10*、*daam1* (disheveled-associated activator of morphogenesis 1) 和 *fscn1* (fascin1) 等]的 mRNA 增加,而颗粒细胞微绒毛的增加同时也促进了颗粒

细胞产生的物质和信号分子能够更有效地传递至卵母细胞。进一步刺激卵母细胞内 GDF9 的生成, 能增强颗粒细胞与卵母细胞的通讯和交换^[63]。上述研究表明, 卵泡发育过程中的细胞精细结构变化, 与卵泡的发育与选择具有密切的关系。然而, 由于缺乏相应的工具与技术手段, 目前与之相关的机制我们知之甚少, 进一步的研究有待加强。

2.3 线粒体动力学稳态调控卵泡发育

在卵泡快速生长、体积快速增加的过程中, 对于能量和营养的需求显然非常巨大。线粒体是细胞的动力源, 可为细胞的正常生命活动提供必需的能量, 其动力学稳态(包括分裂、融合以及增殖)对细胞的生长发育非常重要。卵母细胞是机体内富含线粒体数量最多的细胞之一^[64]。Udagawa 等人研究发现, 调控线粒体分裂相关基因 *Drp1* 参与调控卵泡发育进而影响卵子质量。在卵母细胞中敲除 *Drp1*, 会导致成年卵巢内卵泡被阻滞在初级和次级卵泡, 但这个表型可以被 FSH 所部分挽救。*Drp1* 缺失的卵母细胞内线粒体和其他细胞器(如内质网和分泌囊泡)高度聚集, 并且 Ca^{2+} 信号通路受损, 卵子成熟异常^[65]。线粒体融合相关基因 *miga* (mitoguardin) 编码蛋白 Miga1/2, 其通过与线粒体外膜蛋白线粒体磷脂酶 D 相互作用促进线粒体融合。*miga1* 和 *miga2* 单基因敲除和双基因敲除小鼠卵泡内的线粒体形态和功能紊乱。敲除的雌性小鼠生育能力降低, 并且其卵泡内颗粒细胞凋亡明显增加, 黄体类固醇激素的合成受到严重影响(表 1)。因此, 卵泡内线粒体动力学的稳态直接调控着卵巢内激素的合成、卵泡的生长和卵子质量^[66]。

此外, 女性机体代谢对于卵泡发育和卵子质量也有着非常重要的影响, 研究表明肥胖、糖尿病和胰岛素抵抗患者的卵母细胞存在线粒体功能障碍, 卵子质量异常, 且后代健康严重缺陷^[67, 68], 但其内在调控机制目前还所知不多。

3 卵巢微环境对卵泡的发育调控

卵泡发育主要依赖于机体环境、卵巢环境及卵泡局部环境之间的互作性与整体性。在生理层面, 一方面卵泡通过与机体的互作, 在内分泌层面获得其发育所需的相关激素及营养; 另一方面, 卵泡将自身产生的性激素及其他相关因子分泌至周身, 从而影响雌性动物生理。因而, 在进行卵泡发育调控机制研究中, 不可忽视的一个问题即是在体状况下, 局部微环境是如何构建卵泡-周围组织、卵泡-卵泡之间的有序交流的。

3.1 卵巢内血管与卵泡发育

卵巢作为为数不多的具有持续性成年血管新生过程的器官, 伴随着发育, 卵泡内膜层细胞之间的血管网络越加密集^[44, 48]。而目前认为, 血管系统的维持和持续生成成为卵泡发育和黄体建立提供所需的营养、氧气和激素支持, 并促进类固醇激素的释放。有研究表明, 短时间的血管生成抑制会导致卵巢发育异常, 有腔卵泡发育的减缓甚至停滞, 排卵中断和黄体功能性异常^[69, 70]。值得注意的是, 在普遍认知中, 成年哺乳动物的血管生成通常只发生于肿瘤和伤口愈合等病理条件, 但是在正常生理情况下, 只有卵巢内血管会随着卵泡的不断募集和排卵带来的卵巢周期性变化发生持续生成和退化, 而其持续

表1. 卵泡发育过程中相关基因及其敲除小鼠卵泡表型

Table 1. The phenotype of folliculogenesis related gene defects mouse models

Gene name	Phenotype	Reference
<i>Rptor</i>	Defects in primordial follicle activation	[17]
<i>Kitl</i>	Reduced germ cells and defects in primordial follicle activation	[17]
<i>pTEN</i>	Global follicular activation and early follicular depletion	[20]
<i>p27</i>	Premature activation of the primordial follicle pool and follicle depletion	[19]
<i>Foxo3a</i>	Global follicular activation and early follicular depletion	[21]
<i>Cdc42</i>	Defects in primordial follicle activation	[24]
<i>Gdf9</i>	Folliculogenesis arrest at the one-layer follicle stage	[50]
<i>Ggpp</i>	Folliculogenesis arrest at the one-layer follicle stage	[53]
<i>Mtor</i>	Defects in follicular development and GC showed some characteristics of immature Sertoli cells	[54]
<i>Furin</i>	Early secondary follicles increased, mature follicles decreased	[55]
<i>Drp1</i>	Defects in primary and secondary follicles development	[65]
<i>Miga (Miga1/2)</i>	Defects in luteinization and steroidogenesis	[66]

的时间长达数十年，几乎与女性生殖寿命相等^[71, 72]。

目前研究显示原始卵泡和初级卵泡周围没有血管的紧密围绕，其营养和氧气供应主要来源于卵巢间质中的血管。而生长卵泡产生膜层后，卵泡膜层内则具有丰富的血管网络^[73]。上述研究表明了卵泡血管可能与卵泡选择有关。的确，研究表明优势卵泡可能拥有更加丰富的血管网络，这可能促进了促性腺激素的优先供给^[74, 75]。同时，卵泡周围血管内的血流速度在某些哺乳动物中是鉴别优势卵泡的早期参数之一^[76]。目前对于卵巢内血管是如何维持长达数十年的持续更新，而血管新生又是如何维持雌性哺乳动物漫长生育周期中富于变化的发育过程的，目前相关研究基本处于空白，亟待加强。

3.2 卵巢间质环境与卵泡发育

纵观雌性哺乳动物的整个生殖寿命中，不仅发情周期内卵泡经历剧烈的生长变化，宏观上卵巢也同样经历着周期性和衰老性两个方面的广泛而动态的结构变化。卵巢整体性的环境变化显然对于卵泡的生长发育和生殖衰老都有着影响，然而相关研究目前较为欠缺。研究表明细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的机械信号可以通过整合素、细胞黏附分子、细胞骨架和信号级联传递至细胞内部，引起细胞内一系列信号通路的激活或者抑制，甚至可以影响细胞核内基因的转录和染色体高级结构的改变^[77]。

卵巢的 ECM 在卵泡发育中起着重要的作用。原始卵泡激活后，生长卵泡向卵巢髓质区域迁移，可能是因为髓质基质环境相比于皮质区松散柔韧，为卵泡的快速生长提供一个较为宽松的物理环境^[78]。对于多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 患者的研究显示，其卵巢皮质区域刚性增强且胶原蛋白含量增加^[79]，提示了卵巢基质变化可能与卵巢病理变化直接相关。

此外，卵巢的间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 对于维持卵巢整体的环境、调控卵巢和生殖衰老也具有重要的作用。体外研究显示 MSC 会分泌血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 和肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 等生长因子，这些因子可以减少颗粒细胞的凋亡^[80]。近期研究表明，卵巢 MSC 注射可能对化疗导致卵巢早衰有一定保护作用，MSC 处理可提高卵泡的存活率并促进卵泡的发育^[81, 82]。

这些研究对于研究卵巢衰老和延长女性生殖寿命有着一定的启示作用。

4 展望

近年来，我国育龄夫妇的生殖障碍问题日益突出，并呈现逐渐加剧的趋势。中国人口协会、国家计生委联名发布的《中国不孕不育现状调研报告》显示，至 2016 年，在我国育龄夫妇中，约有 15%~20% 发生不孕、不育问题。其中约 1% 的育龄女性由于卵巢早衰导致不育，5%~10% 的育龄女性由于 PCOS 导致不育。此两种导致女性生育障碍的疾病均与卵泡发生和发育异常密切相关^[4]。

卵巢早衰患者在临床上表征为 40 岁之前停经，且血清中 FSH 水平高于 40 IU/L^[4]。由于卵巢早衰患者普遍缺乏可以响应激素的卵泡，或由于停经较早而缺乏生长卵泡，因此传统的辅助生殖技术治疗效果甚微。其本质是由于卵巢早衰患者卵巢内的原始卵泡无法正常激活，针对这个情况，IVA 技术应运而生，即通过体外激活女性体内的原始卵泡，使其生长至可响应激素刺激的阶段，随后进行常规体外人工受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 处理。目前，IVA 主要是利用原始卵泡激活通路“前颗粒细胞 mTORC1-KITL- 卵母细胞 -KIT-PI3K”信号通路进行调控，如 PTEN 抑制剂 (bpV)、PI3K 激活剂 (740Y-P)、mTORC1 的激活剂磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 和普萘洛尔等^[83-87]，这些药物可以在体外处理小鼠卵巢或卵巢早衰女性卵巢皮质片从而激活原始卵泡。这些被激活的原始卵泡可以进一步发育，并得到成熟的卵子。此外，临床研究表明卵巢表面的机械损伤如卵巢的楔形切除和卵巢打孔可以促进卵泡的激活和生长^[88]。卵泡激活剂的联合使用并结合卵巢打孔技术，可以使原始卵泡的激活效率提高，达到更为有效的治疗效果^[86]。但是值得注意的是，目前 IVA 效率依旧较低，且在治疗过程中需多次进行腹腔镜手术且需取出患者部分卵巢，因此也限制了患者的治疗次数。所以如何提高并改进患者原始卵泡激活效率和方法对于治疗卵巢早衰疾病十分关键。

PCOS 是一种病因不清，且具有多种病理表征的女性内分泌疾病，其占排卵障碍患者的 80%^[89]。PCOS 不仅是一种生殖系统疾病，同时也是一种危害女性全身健康的内分泌代谢疾病。Rotterdam 标准 (2003) 是目前推荐的 PCOS 诊断的标准，它需要满足以下三个临床表征中的两个：慢性排卵障碍；

临床或生化高雄激素血症；超声检测显示多囊卵巢形态 (polycystic ovarian morphology, PCOM) [90]。目前, PCOS 的发病机制尚不清楚, 但它被认为是一种涉及遗传和环境因素的多因素疾病。PCOS 的临床特征包括: 生殖功能障碍 (不孕症, 妊娠相关风险)、代谢紊乱 (肥胖, 胰岛素抵抗、妊娠期糖尿病、2 型糖尿病和心血管危险因素) 和心理疾病特征 (焦虑和抑郁, 生活质量受损, 身体形象和进食障碍) [91, 92]。卵巢功能受 PCOS 的多种因素影响, 如个体超重、高雄激素血症和缺乏促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 峰等均可导致排卵和生育障碍。患者的下丘脑 - 垂体 - 性腺 (卵巢) 轴反馈和其代谢出现明显的异常 [93]。因此, PCOS 的治疗方法主要可以分为: (1) 直接调控下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴 (柠檬酸克罗米芬 [94], 芳香酶抑制剂 [95], 促性腺激素 [96], 腹腔镜卵巢钻孔 [88] 和辅助生殖技术 [97]); (2) 改善患者代谢异常, 从而有可能间接调控下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴 (生活方式的改变 [89]、减肥手术 [98]、胰岛素增敏剂 [99] 和肌醇 [100] 等) [92]。由于 PCOS 病因不清, 病情复杂且病程漫长, 因此对于 PCOS 病因的深入研究和临床预警是十分迫切且必要的。

此外, 随着医疗技术、营养条件等多方面因素的改善, 女性个体寿命不断延长, 使得绝经后生存年限不断增加。如何通过改善卵巢健康延缓卵巢衰老, 进而提升女性相关生活质量的需求也日益提升。上述问题的解决, 需要在生理层面加深对于卵泡发育的机制探索, 并依托于基础研究开发或改进辅助生殖技术, 进而探索延长女性生殖寿命的有效治疗方案。

近年来, 随着各种单细胞组学、基因修饰、表观遗传、CRISPR/Cas9 基因编辑技术及高分辨率显微镜等新技术的引入, 对卵泡发育过程调控及功能的了解有了跨越式进步。例如, 利用细胞特异性 Cre 与荧光报告或敲除小鼠相结合, 特异性标记卵巢内的细胞进而对卵泡细胞的发育命运进行追踪和对不同卵巢细胞内关键基因进行操纵, 从而明确了卵泡各个组分在卵泡发育过程中调控作用, 并且可以追踪卵泡内单个细胞的来源和发育命运, 为绘制漫长生殖周期内各个细胞的命运图谱奠定了基础 [13]。Zhang 等人 (2018) 利用单细胞 RNA-seq 分析研究了人类卵泡发育过程中各个级别卵泡的卵母细胞和颗粒细胞的转录组谱和基因特征, 从宏观大数据角度对卵泡内各组分的转录组有了明确的认识, 并确定

了一些调控卵巢储备的分泌性标志物 [101], 为今后对卵巢相关疾病的预警提供了重要的理论支持。此外, 对于卵巢和卵泡发育的可视化研究也有了很大的进展, 例如利用荧光素与活体成像技术追踪 FSH 在小鼠体内的循环、定位和富集, 为研究 FSH 靶向选择优势卵泡奠定了技术基础 [102]。而全透明化 3D 卵巢技术的日趋完善, 为系统性全面研究卵巢微环境提供了支持 [70]。因此, 在不断创新的技术支持下, 我们相信未来对于卵泡发育的研究必将会有新的突破和发现。

参考文献

- Zhang H, Zheng W, Shen Y, Adhikari D, Ueno H, Liu K. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(31): 12580–12585.
- Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(43): 17474–17479.
- McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21(2): 200–214.
- Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update* 2015; 21(6): 787–808.
- Thiery M. Reinier De Graaf (1641–1673) and the Graafian follicle. *Gynecol Surg* 2009; 6(2): 189–191.
- Foerster F. Comparative microscopical studies of the ovary. *The American Journal of Obstetrics and Diseases of Women and Children (1869-1919)* 1893; 28(4): 458.
- Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* 1968; 17(3): 555–557.
- Gosden R, Laing S, Felicio L, Nelson JF, Finch C. Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice. *Biol Reprod* 1983; 28(2): 255–260.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones GM, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. Oocyte maturation. *Hum Reprod* 1998; 13(suppl_3): 52–62.
- Tsafiriri A. Follicular development: impact on oocyte quality. In: Fauser BCJM (ed). *FSH Action and Intraovarian Regulation*. New York: Parthenon Press, 1997, 83–105.
- Borum K. Oogenesis in the mouse: a study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res* 1961; 24(3): 495–507.

- 12 Mork L, Maatouk DM, McMahon JA, Guo JJ, Zhang P, McMahon AP, Capel B. Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biol Reprod* 2012; 86(2): 37. doi: 10.1095/biolreprod.111.095208.
- 13 Zheng W, Zhang H, Liu K. The two classes of primordial follicles in the mouse ovary: their development, physiological functions and implications for future research. *Mol Hum Reprod* 2014; 20(4): 286–292.
- 14 Rastetter RH, Bernard P, Palmer JS, Chassot AA, Chen H, Western PS, Ramsay RG, Chaboissier MC, Wilhelm D. Marker genes identify three somatic cell types in the fetal mouse ovary. *Dev Biol* 2014; 394(2): 242–252.
- 15 Feng L, Wang Y, Cai H, Sun G, Niu W, Xin Q, Tang X, Zhang J, Wang C, Zhang H. ADAM10-Notch signaling governs the recruitment of ovarian pregranulosa cells and controls folliculogenesis in mice. *J Cell Sci* 2016; 129(11): 2202–2212.
- 16 Suzuki H, Kanai-Azuma M, Kanai Y. From sex determination to initial folliculogenesis in mammalian ovaries: morphogenetic waves along the anteroposterior and dorsoventral axes. *Sex Dev* 2015; 9(4): 190–204.
- 17 Zhang H, Liu K. Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. *Hum Reprod Update* 2015; 21(6): 779–786.
- 18 Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43–101.
- 19 Rajareddy S, Reddy P, Du C, Liu L, Jagarlamudi K, Tang W, Shen Y, Berthet C, Peng SL, Kaldis P. p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Mol Endocrinol* 2007; 21(9): 2189–2202.
- 20 Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämäläinen T, Peng SL. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 2008; 319(5863): 611–613.
- 21 John GB, Shirley LJ, Gallardo TD, Castrillon DH. Specificity of the requirement for Foxo3 in primordial follicle activation. *Reproduction* 2007; 133(5): 855–863.
- 22 Jiang ZZ, Hu MW, Ma XS, Schatten H, Fan HY, Wang ZB, Sun QY. LKB1 acts as a critical gatekeeper of ovarian primordial follicle pool. *Oncotarget* 2016; 7(5): 5738–5753.
- 23 Ren Y, Suzuki H, Jagarlamudi K, Golnoski K, McGuire M, Lopes R, Pachnis V, Rajkovic A. Lhx8 regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis. *BMC Biol* 2015; 13(1): 39.
- 24 Yan H, Zhang J, Wen J, Wang Y, Niu W, Teng Z, Zhao T, Dai Y, Zhang Y, Wang C. CDC42 controls the activation of primordial follicles by regulating PI3K signaling in mouse oocytes. *BMC Biol* 2018; 16(1): 73.
- 25 Hornick JE, Duncan FE, Shea L, Woodruff TK. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow *in vitro*. *Hum Reprod* 2012; 27(6): 1801–1810.
- 26 Woodruff TK, Shea LD. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28(1): 3–6.
- 27 Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(43): 17474–17479.
- 28 Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 2004; 305(5687): 1157–1159.
- 29 Choi Y, Yuan D, Rajkovic A. Germ cell-specific transcriptional regulator sohlh2 is essential for early mouse folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Biol Reprod* 2008; 79(6): 1176–1182.
- 30 Yu C, Zhang YL, Pan WW, Li XM, Wang ZW, Ge ZJ, Zhou JJ, Cang Y, Tong C, Sun QY. CRL4 complex regulates mammalian oocyte survival and reprogramming by activation of TET proteins. *Science* 2013; 342(6165): 1518–1521.
- 31 Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 2004; 131(4): 933–942.
- 32 Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JJJ, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999; 140(12): 5789–5796.
- 33 Nilsson EE, Detzel C, Skinner MK. Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition. *Reproduction* 2006; 131(6): 1007–1015.
- 34 Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 175(1–2): 123–130.
- 35 Durlinger AA, Visser JJ, Themmen AA. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* 2002; 124(5): 601–609.
- 36 Shimamoto S, Nishimura Y, Nagamatsu G, Hamada N, Kita H, Hikabe O, Hamazaki N, Hayashi K. Hypoxia induces the

- dormant state in oocytes through expression of Foxo3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116(25): 12321–12326.
- 37 Zheng W, Zhang H, Gorre N, Risal S, Shen Y, Liu K. Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. *Hum Mol Genet* 2013; 23(4): 920–928.
- 38 Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev* 2009; 30(5): 438–464.
- 39 Sánchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822(12): 1896–1912.
- 40 Svoboda P, Franke V, Schultz RM. Sculpting the transcriptome during the oocyte-to-embryo transition in mouse. *Curr Top Dev Biol* 2015; 113: 305–349.
- 41 Mahrous E, Yang Q, Clarke HJ. Regulation of mitochondrial DNA accumulation during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Reproduction* 2012; 144(2): 177–185.
- 42 Magoffin DA. Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(7): 1344–1349.
- 43 Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 2009; 30(6): 624–712.
- 44 Rimón-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian folliculogenesis. *Results Probl Cell Differ* 2016; 58: 167–190.
- 45 Matzuk MM, Burns KH. Genetics of mammalian reproduction: modeling the end of the germline. *Annu Rev Physiol* 2012; 74: 503–528.
- 46 Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J* 2000; 19(8): 1745–1754.
- 47 Clarke HJ. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2018; 7(1): e294.
- 48 Knight PG, Satchell L, Glister C. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 359(1–2): 53–65.
- 49 Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth *in vivo*. *Hum Reprod* 2010; 25(12): 2944–2954.
- 50 Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383(6600): 531–535.
- 51 Mottershead DG, Sugimura S, Al-Musawi SL, Li JJ, Richani D, White MA, Martin GA, Trotta AP, Ritter LJ, Shi J. Cumulin, an oocyte-secreted heterodimer of the transforming growth factor- β family, is a potent activator of granulosa cells and improves oocyte quality. *J Biol Chem* 2015; 290(39): 24007–24020.
- 52 Liu C, Peng J, Matzuk MM, Yao HH. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nat Commun* 2015; 6: 6934.
- 53 Jiang C, Diao F, Sang YJ, Xu N, Zhu RL, Wang XX, Chen Z, Tao WW, Yao B, Sun HX, Huang XX, Xue B, Li CJ. GGPP-mediated protein geranylgeranylation in oocyte is essential for the establishment of oocyte-granulosa cell communication and primary-secondary follicle transition in mouse ovary. *PLoS Genet* 2017; 13(1): e1006535.
- 54 Guo J, Zhang T, Guo Y, Sun T, Li H, Zhang X, Yin H, Cao G, Yin Y, Wang H. Oocyte stage-specific effects of MTOR determine granulosa cell fate and oocyte quality in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(23): E5326–E5333.
- 55 Meng TG, Hu M-W, Ma XS, Huang L, Liang QX, Yuan Y, Hou Y, Wang H, Schatten H, Wang ZB, Sun QY. Oocyte-specific deletion of furin leads to female infertility by causing early secondary follicle arrest in mice. *Cell Death Dis* 2017; 8(6): e2846.
- 56 Killingbeck EE, Swanson WJ. Egg coat proteins across metazoan evolution. *Curr Top Dev Biol* 2018; 130: 443–488.
- 57 Raj I, Al Hosseini HS, Dioguardi E, Nishimura K, Han L, Villa A, De Sanctis D, Jovine L. Structural basis of egg coat-sperm recognition at fertilization. *Cell* 2017; 169(7): 1315–1326. e1317.
- 58 Phillips DM, Shalgi R. Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *J Ultrastruct Res* 1980; 72(1): 1–12.
- 59 Rankin T, Familiari M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J. Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 1996; 122(9): 2903–2910.
- 60 Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(5): 2890–2894.
- 61 Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(3): 141–152.
- 62 Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001; 121(5): 647–653.
- 63 El-Hayek S, Yang Q, Abbassi L, Fitzharris G, Clarke HJ. Mammalian oocytes locally remodel follicular architecture to provide the foundation for germline-soma communication. *Curr Biol* 2018; 28(7): 1124–1131.
- 64 May-Panloup P, Boucrot L, Chao de la Barca JM, Desquiere-Dumas V, Ferre-L’Hotellier V, Moriniere C, Descamps P, Procaccio V, Reynier P. Ovarian ageing: the role

- of mitochondria in oocytes and follicles. *Hum Reprod Update* 2016; 22(6): 725–743.
- 65 Udagawa O, Ishihara T, Maeda M, Matsunaga Y, Tsukamoto S, Kawano N, Miyado K, Shitara H, Yokota S, Nomura M. Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. *Curr Biol* 2014; 24(20): 2451–2458.
- 66 Liu XM, Zhang YL, Ji SY, Zhao LW, Shang WN, Li D, Chen Z, Tong C, Fan HY. Mitochondrial function regulated by mitoguardin-1/2 is crucial for ovarian endocrine functions and ovulation. *Endocrinology* 2017; 158(11): 3988–3999.
- 67 Moran LJ, Pasquali R, Teede HJ, Hoeger KM, Norman RJ. Treatment of obesity in polycystic ovary syndrome: a position statement of the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Fertil Steril* 2009; 92(6): 1966–1982.
- 68 Han L, Ren C, Li L, Li X, Ge J, Wang H, Miao YL, Guo X, Moley KH, Shu W. Embryonic defects induced by maternal obesity in mice derive from Stella insufficiency in oocytes. *Nat Genet* 2018; 50(3): 432–442.
- 69 Robinson RS, Woad KJ, Hammond AJ, Laird M, Hunter MG, Mann GE. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction* 2009; 138(6): 869–881.
- 70 Feng Y, Cui P, Lu X, Hsueh B, Billig FM, Yanez LZ, Tomer R, Boerboom D, Carmeliet P, Deisseroth K. CLARITY reveals dynamics of ovarian follicular architecture and vasculature in three-dimensions. *Sci Rep* 2017; 7: 44810.
- 71 Reynolds LP, Redmer DA. Growth and development of the corpus luteum. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; 54: 181–191.
- 72 Fraser HM, Lunn SF. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction* 2001; 121(3): 355–362.
- 73 Abdel-Ghani M, Shimizu T, Suzuki H. Expression pattern of vascular endothelial growth factor in canine folliculogenesis and its effect on the growth and development of follicles after ovarian organ culture. *Reprod Domest Anim* 2014; 49(5): 734–739.
- 74 Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE Jr. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 1981; 109(2): 356–362.
- 75 Acosta TJ. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *J Reprod Dev* 2007; 53(1): 39–44.
- 76 Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci* 2004; 82: 127–140.
- 77 Mammoto A, Mammoto T, Ingber DE. Mechanosensitive mechanisms in transcriptional regulation. *J Cell Sci* 2012; 125(13): 3061–3073.
- 78 West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on *in vitro* follicle development. *Biomaterials* 2007; 28(30): 4439–4448.
- 79 Hughesdon P. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called “hyperthecosis”. *Obstet Gynecol Surv* 1982; 37(2): 59–77.
- 80 Fu X, He Y, Xie C, Liu W. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy* 2008; 10(4): 353–363.
- 81 Wang S, Yu L, Sun M, Mu S, Wang C, Wang D, Yao Y. The therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice premature ovarian failure. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 690491. doi: 10.1155/2013/690491.
- 82 Fouad H, Sabry D, Elsetohy K, Fathy N. Therapeutic efficacy of amniotic membrane stem cells and adipose tissue stem cells in rats with chemically induced ovarian failure. *J Adv Res* 2016; 7(2): 233–241.
- 83 Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan EK, Hsueh AJ. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(22): 10280–10284.
- 84 Taga M, Mouton-Liger F, Paquet C, Hugon J. Modulation of oxidative stress and tau phosphorylation by the mTOR activator phosphatidic acid in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 2011; 585(12): 1801–1806.
- 85 Frondorf K, Henkels KM, Frohman MA, Gomez-Cambornero J. Phosphatidic acid is a leukocyte chemoattractant that acts through S6 kinase signaling. *J Biol Chem* 2010; 285(21): 15837–15847.
- 86 Sun X, Su Y, He Y, Zhang J, Liu W, Zhang H, Hou Z, Liu J, Li J. New strategy for *in vitro* activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. *Cell Cycle* 2015; 14(5): 721–731.
- 87 Hornberger T, Chu W, Mak Y, Hsiung J, Huang S, Chien S. The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(12): 4741–4746.
- 88 Farquhar C, Brown J, Marjoribanks J. Laparoscopic drilling by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 22(6): 687–708.
- 89 Balen AH, Morley LC, Misso M, Franks S, Legro RS, Wijeyaratne CN, Stener-Victorin E, Fauser BC, Norman RJ, Teede H. The management of anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guid-

- ance. *Hum Reprod Update* 2016; 22(6): 687–708.
- 90 Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004; 19(1): 41–47.
- 91 Teede HJ, Misso ML, Deeks AA, Moran LJ, Stuckey BG, Wong JL, Norman RJ, Costello MF, Groups GD. Assessment and management of polycystic ovary syndrome: summary of an evidence-based guideline. *Med J Aust* 2011; 195: S65–S112.
- 92 Artini PG, Obino MER, Sergiampietri C, Pinelli S, Papini F, Casarosa E, Cela V. PCOS and pregnancy: a review of available therapies to improve the outcome of pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2018; 13(2): 87–98.
- 93 Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JDF, Fauser BC. A nomogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhic infertility. *Fertil Steril* 2002; 77(1): 91–97.
- 94 Brown J, Farquhar C, Beck J, Boothroyd C, Hughes E. Clomiphene and anti-oestrogens for ovulation induction in PCOS. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (4): CD002249. doi: 10.1002/14651858.CD002249.pub4.
- 95 Mitwally MF, Casper RF. Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. *Fertil Steril* 2001; 75(2): 305–309.
- 96 Hamilton-Fairley D, Kiddy D, Watson H, Sagle M, Franks S. Low-dose gonadotrophin therapy for induction of ovulation in 100 women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1991; 6(8): 1095–1099.
- 97 Kollmann M, Martins W, Lima M, Craciunas L, Nastri C, Richardson A, Raine-Fenning N. Strategies for improving outcome of assisted reproduction in women with polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; 48(6): 709–718.
- 98 Malik SM, Traub ML. Defining the role of bariatric surgery in polycystic ovarian syndrome patients. *World J Diabetes* 2012; 3(4): 71–79.
- 99 Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandaraki E, Economou FN. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2010; 162(2): 193–212.
- 100 Bevilacqua A, Bizzarri M. Physiological role and clinical utility of inositols in polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2016; 37: 129–139.
- 101 Zhang Y, Yan Z, Qin Q, Nisenblat V, Chang HM, Yu Y, Wang T, Lu C, Yang M, Yang S. Transcriptome landscape of human folliculogenesis reveals oocyte and granulosa cell interactions. *Mol Cell* 2018; 72(6): 1021–1034. e1024.
- 102 Feng Y, Zhu S, Antaris AL, Chen H, Xiao Y, Lu X, Jiang L, Diao S, Yu K, Wang Y. Live imaging of follicle stimulating hormone receptors in gonads and bones using near infrared II fluorophore. *Chem Sci* 2017; 8(5): 3703–3711.