



李晶博士, 现任南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室教授、博士生导师。团队主要从事哺乳动物卵巢卵泡发育机制以及卵巢相关疾病发病机制的研究, 成果多次发表于国际知名生物学或生殖内分泌学刊物如*Nat Cell Biol*、*Autophagy*、*Mol Ther*、*PNAS*等。建立了原始卵泡体外激活技术(以下简称IVA技术), 证明卵巢内静息卵泡可以通过人工手段调节其发育进程。2013年10月, IVA技术在临床上成功应用治疗女性卵巢早衰, 2018年, 团队自主研发的二代IVA技术成功应用于临床, 已有4名婴儿出生。

原始卵泡库的形成、维持和激活分子调控机制 研究进展及其临床应用

傅嘉怡 王克瀚 陈琦 李晶*

(南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室, 南京 211166)

摘要 卵泡是哺乳动物卵巢结构和功能的基本单位, 由位于中央的卵子和周围的体细胞组成。原始卵泡是卵泡发育的最早阶段, 在哺乳动物出生前后形成。由于数量有限, 原始卵泡构成了卵巢的储备库, 为女性的生殖周期提供成熟卵子。原始卵泡在大部分时间内处于休眠状态, 直到被激活后开始生长和发育, 最终成为可排卵的成熟卵泡。原始卵泡休眠与激活的动态平衡对于卵巢生殖功能的维持非常重要, 而各种因素导致的原始卵泡库提前耗竭则可能引起女性的早发性卵巢功能不全。该文系统总结了过去二十年关于原始卵泡形成和激活分子机制的研究进展, 全面概述了原始卵泡体外激活技术的发展和在治疗早发性卵巢功能不全或卵巢功能障碍导致的不孕症患者中的临床应用。此外, 该文就如何调节原始卵泡库来保护卵巢储备、延缓卵巢衰老方面的研究也进行了讨论, 为诊断和治疗与卵泡发育相关的疾病、卵巢性不孕不育的干预以及女性生育力保存提供了新的思路。

关键词 原始卵泡; 原始卵泡激活; 原始卵泡体外激活技术; 卵巢衰老

Research Progress and Clinical Application of Molecular Regulatory Mechanisms for the Formation, Maintenance, and Activation of the Primordial Follicles

FU Jiayi, WANG Kehan, CHEN Qi, LI Jing*

(State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

收稿日期: 2024-01-02

接受日期: 2024-03-12

国家重点研发计划(批准号: 2022YFC2703000)资助的课题

*通信作者。Tel: 18012935416, E-mail: ljw@njmu.edu.cn

Received: January 2, 2024

Accepted: March 12, 2024

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2022YFC2703000)

*Corresponding author. Tel: +86-18012935416, E-mail: ljw@njmu.edu.cn

Abstract The follicle is the basic unit of the ovary, consisting of a centrally located oocyte and the surrounding somatic cells (granulosa cells and theca). In mammals, primordial follicles are formed in limited numbers before or after birth. These follicles remain dormant for most of the time, comprising the ovarian reserve and supplying mature oocytes during a female's reproductive life. Activation of primordial follicles into growing stage is referred as the initial follicle recruitment. The dynamic balance between dormancy and activation of primordial follicles is crucial for maintaining ovarian reproductive function, while premature depletion of the primordial follicle pool due to various factors may lead to premature ovarian insufficiency in females. This review outlines the importance of the events leading to the establishment of the ovarian reserve and highlights the fundamental factors and molecular networks known to influence primordial follicle activation in mouse. This review provides a comprehensive overview of the development and clinical application of *in vitro* activation of primordial follicles for the treatment of infertility in patients with premature ovarian insufficiency or ovarian dysfunction. Other research progress in the manipulation of the primordial follicle pool aimed at delaying ovarian aging and fertility preservation is also discussed.

Keywords primordial follicles; activation of primordial follicles; *in vitro* activation of primordial follicles; ovarian aging

卵巢结构和功能的基本单位是卵泡,按照其直径大小和发育状态可以分为原始卵泡(静息卵泡)和生长卵泡(包括初级卵泡、次级卵泡、有腔卵泡和排卵前卵泡)^[1]。在雌性哺乳动物中,由于原始卵泡的数量是固定的且不可再生,因此,原始卵泡库是整个生殖生命中可受精卵子的唯一来源^[2]。

原始卵泡形成之后,大部分会处于休眠状态,仅有一小部分会在接收到卵泡周围的信号刺激后被募集到生长卵泡池中,这种以卵母细胞迅速增大和扁平颗粒细胞转变为柱状颗粒细胞为特征的卵泡变化称为原始卵泡激活(primordial follicle activation, PFA)。原始卵泡激活进入生长卵泡阶段的过程称为初始募集,在这个过程中,原始卵泡的数量会逐渐减少,直至消耗殆尽。当人类女性卵巢中原始卵泡的数量低于1 000个时,卵巢会停止排卵,这标志着女性生殖生命结束,进入更年期。

原始卵泡库的建立和原始卵泡休眠与激活之间的动态平衡对于女性生育力的维持非常重要,在40岁之前,女性卵巢中原始卵泡库的过早耗竭会导致原发性卵巢功能不全等疾病发生,也会引起女性内分泌紊乱和衰老^[3]。因此,了解原始卵泡形成和激活的相关过程和分子调控机制对于解决卵巢相关疾病和卵源性不孕不育问题至关重要,而影响因子和信号通路的归纳也将有助于基础理论和临床应用的结合,为开发更多不孕不育的治疗技术提供思路,还可以为女性生育力保存和延缓衰老作贡献。

1 原始卵泡形成的分子机制

1.1 原始卵泡形成的转录调控机制

在雌性哺乳动物中,原始卵泡的形成代表了卵泡发生的开始。人类原始卵泡的形成始于妊娠中期(17~19周),而小鼠原始卵泡的形成始于胚胎第17.5天(E17.5),并在出生后的3~5天(P3~P5)内完成^[4]。在卵泡形成之前,生殖细胞通过同步的不完全有丝分裂形成生殖细胞囊(germ line cysts)。在E14.5减数分裂起始之前,这些生殖细胞囊发生断裂形成较小的细胞囊并逐渐失去同步性,与其他断裂的细胞囊融合在一起形成生殖细胞嵴(germ line nests)。随后的步骤包括减数分裂起始、生殖细胞囊的破裂(germ line cyst breakdown, CBD)和卵泡组装,这些步骤在卵巢中以时间和空间不同步的方式进行。在小鼠中,减数分裂从卵巢轴线的前端到后端呈前-后方向进行;CBD和卵泡组装则从髓质区域开始,向皮质区域扩散。卵泡组装的另一个特点是大量卵母细胞发生程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),只有三分之一的卵母细胞留下形成原始卵泡。最近的一项研究发现,在原始卵泡形成时,生殖细胞囊中会有生殖细胞从相邻的生殖细胞获得细胞器形成balbiani body,而这个生殖细胞最终会被前颗粒细胞包围形成原始卵泡^[5]。上述结果表明了即将形成卵泡的卵母细胞的选择,然而,相关机制仍然未知,很难预测整个过程中每个细胞的命运。单细胞测序技术的迅速发展,使得研究原始卵泡形成过程中各种

细胞相互作用的机制成为可能。通过收集P0.5小鼠卵巢中的生殖细胞进行单细胞测序,可以鉴别出3个细胞类群分别对应此时生殖细胞的3种状态:处于生殖细胞囊的生殖细胞,生殖细胞囊破裂正在形成原始卵泡的生殖细胞以及已经形成原始卵泡的卵母细胞。拟时间向(pseudo timeline analysis)分析可以描绘出在原始卵泡形成过程中,从生殖细胞到成为卵母细胞的发育路径以及在此过程中基因表达的动态变化,而转录调控网络的构建则鉴定出了一系列在此过程中发挥作用的关键转录因子,比如转录因子ID家族成员ID1和ID2^[6]。此外,通过收集E16.5、P0和P3小鼠卵巢进行单细胞测序共鉴别出5个生殖细胞群和6个颗粒细胞群。进一步的拟时间向分析发现无论是生殖细胞还是颗粒细胞都可以划分为3个细胞状态和1个细胞命运的节点^[7]。另有研究通过收集从E11.5到P5的小鼠卵巢进行单细胞测序,在此过程中生殖细胞包括无法形成卵泡凋亡的生殖细胞在内共6个细胞群^[8]。与前述研究一致,Wnt阳性的具有双潜能的前体细胞在E12.5分化为表达FOXL2阳性的双潜能前颗粒细胞(bipotential pregranulosa cell, BPG),而另一种前颗粒细胞也是在E12.5由卵巢上皮分化而来表达LGR5的上皮前颗粒细胞(epithelial pregranulosa cell, EPG)。从E19.5开始,EPG主要分布于卵巢皮质,其形成的原始卵泡会维持在休眠状态,而BPG主要分布于髓质区域,其形成的原始卵泡立即被激活,然后在青春期早期消耗殆尽。在原始卵泡形成后(P5),所有原始卵泡颗粒细胞均表达FOXL2。可见,在原始卵泡形成过程中,卵母细胞和前颗粒细胞的基因表达都发生动态变化,并受到一系列转录因子的调控。下面将简要介绍在卵母细胞和颗粒细胞中发挥作用的关键转录因子。

1.1.1 卵母细胞中的转录因子与原始卵泡形成 在过去的十几年里,基因敲除小鼠的研究鉴定出了一系列卵母细胞特异性转录因子在原始卵泡形成中的重要作用。这其中包括FIGLA(folliculogenesis specific bHLH transcription factor)、NOBOX(NOBOX oogenesis homeobox)、SOHLH1(spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1)、SOHLH2(spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2)和LHX8(LIM homeobox 8)。FIGLA是一种生殖细胞特异性的基本螺旋-环-螺旋转录因子。在小鼠中,FIGLA于E13.5开始在生殖细

胞中表达;人卵巢中FIGLA的表达水平从妊娠第19周时开始升高^[9]。缺失*Figla*的小鼠卵巢中的原始卵泡无法形成^[10]。NOBOX在小鼠E15的生殖细胞中检测到表达,而后在卵母细胞中持续高表达^[11]。缺乏*Nobox*的小鼠无法正常形成原始卵泡,卵母细胞的发育存在缺陷,表现为直径小于20 μm且周围颗粒细胞数量减少^[11]。SOHLH1/SOHLH2与性腺发育密切相关。在小鼠中,SOHLH信号主要在原始卵泡的卵母细胞中表达;在人卵巢中,SOHLH信号主要在原始卵泡的卵母细胞和颗粒细胞中表达,并且SOHLH1的表达强于SOHLH2^[12]。敲除*Sohlh1*或*Sohlh2*的小鼠都是不育的,原因在于原始卵泡形成缺陷以及颗粒细胞无法正常分化成立方体和多层结构^[13]。在缺乏SOHLH1时,SOHLH2的表达会下调;同样地,在缺乏SOHLH2时,SOHLH1的表达也会下调,表明SOHLH1和SOHLH2之间可能存在相互调控关系^[14]。LHX8在小鼠卵巢中从E18.5开始表达^[9]。全身敲除*Lhx8*的小鼠原始卵泡形成存在缺陷^[15]。卵母细胞特异性敲除*Lhx8*会引起原始卵泡过度激活和原始卵泡库提前耗竭^[16]。以上基因均在人类卵巢早衰中存在突变^[17-21],并且以上基因敲除的共同特点是都会引起一系列卵母细胞特异性基因(如*Bmp15*、*Gdf9*、*Oct4*、*Zar1*等)的表达下调,而这四个转录因子彼此之间的调控关系通过基因敲除小鼠联合转录组测序也正逐渐变得明朗,比如,FIGLA缺失能够下调转录因子NOBOX、LHX8、TAF4b、SOHLH1和SOHLH2的表达,并且在出生前后的卵巢中这四种转录因子在一部分生殖细胞中呈现共定位,它们彼此之间通过直接相互作用构成调控网络在维持卵母细胞存活和原始卵泡形成过程中发挥重要作用^[9]。

1.1.2 颗粒细胞中转录因子与原始卵泡形成 除了卵母细胞特异的转录因子外,基因敲除小鼠的研究也鉴定出了一系列颗粒细胞特异性转录因子在原始卵泡形成中的重要作用。这其中包括FOXL2(forkhead box L2)、IRX3(iroquois homeobox 3)、IRX5(iroquois homeobox 5)、TAF4b(TATA-box binding protein associated factor 4b)等。FOXL2参与调控性腺分化、卵泡发育等过程。FOXL2在小鼠卵巢的颗粒细胞中表达。关于FOXL2在原始卵泡形成和发育中的作用存在一定争议,有研究发现敲除*Foxl2*的小鼠原始卵泡形成存在严重缺陷并且是不育的^[22],但同年的另一项研究表明缺乏*Foxl2*的

小鼠卵巢中原始卵泡是正常形成的,只是前颗粒细胞不能够在形态上向立方体转变^[23]。IRX3和IRX5在小鼠妊娠期间的前颗粒细胞中表达;原始卵泡形成后,开始在卵母细胞中也表达^[24]。在胚胎早期,IRX3和IRX5均作用于颗粒细胞,随后,IRX3被转移到卵母细胞中表达并继续和还在颗粒细胞中表达的IRX5协同作用来支持卵泡的生长发育。研究发现,单独突变*Irx3*或*Irx5*就会导致小鼠生育能力受损,而双基因敲除则会导致卵巢组织形态异常和卵泡异常死亡^[25]。TAF4b是转录因子TAFIID的一个亚基,能够维持细胞活性和细胞周期进展。在小鼠中,TAF4b主要分布于卵巢颗粒细胞中,研究表明缺失*Taf4b*的小鼠会出现卵巢早衰和不育,原始卵泡的形成存在缺陷并伴有大量丢失^[26-27]。此外,*TAF4b*基因突变也与女性卵巢早衰的发病密切相关。

1.2 体细胞-生殖细胞互作在原始卵泡形成中的重要作用

卵母细胞和颗粒细胞之间的相互交流是CBD和原始卵泡形成的关键。早在E13.5,小鼠卵巢生殖细胞囊内靠近环沟(ring canals)的生殖细胞就与体细胞开始建立联系^[28]。生殖细胞和颗粒细胞前体细胞的同步分化是原始卵泡形成的基础,上述特异性转录因子在指导卵母细胞和颗粒细胞同步发育和相互交流中发挥重要作用。虽然目前已经有许多分子被报道能够调节原始卵泡的形成,然而关于这些分子组成的信号网络和转录调控如何协同作用来调节两个不同的细胞类型形成一个功能单位的机制并不清楚。

1.2.1 Notch信号通路

Notch(neurogenic locus notch homolog protein)是由细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域组成的单跨膜受体。Notch信号是一条高度保守的细胞间通路,包括Notch受体(Notch1~4)、配体(Jagged1、Jagged2、delta-like1、delta-like3、delta-like4)、细胞内效应分子、CSL-DNA结合蛋白及调节分子等组分。在小鼠卵巢中,Notch1在前颗粒细胞中表达,Notch2在前颗粒细胞和颗粒细胞中表达,而Jagged1在卵母细胞中表达^[29]。研究发现,孕酮通过影响Notch信号通路抑制原始卵泡形成^[30]。向体外培养的卵巢中加入特异性Notch信号阻断剂,发现颗粒细胞的增殖被抑制,卵母细胞第1次减数分裂进程受阻,原始卵泡形成受损^[31]。颗粒细胞特异性敲除*Notch2*和卵母细胞缺失*Jagged1*

的雌性小鼠卵巢中都出现了异常的多卵母细胞和无颗粒细胞的卵泡,进一步证明了Notch信号通路介导的体细胞和生殖细胞互作对于原始卵泡形成是必需的^[32]。转录因子HES1属于基本螺旋-环-螺旋家族,在*Hes1*敲除的小鼠卵巢中,卵母细胞的形态变小且数量减少^[33]。由于在体外使用Notch抑制剂培养卵巢的实验中发现*Hes1*启动子活性和HES1蛋白质水平均下降,并且卵母细胞出现与*Hes1*敲除小鼠相同的表型,因此HES1可能位于Notch信号通路下游参与调节原始卵泡的形成。ADAM10(ADAM metalloproteinase domain 10)是一种质膜蛋白酶,研究表明,在原始卵泡形成阶段,ADAM10通过Notch信号控制小鼠卵巢的前颗粒细胞发育参与调控原始卵泡的形成^[34]。NR5A1(nuclear receptor subfamily 5 group A member 1)对两性性腺发育也非常重要,条件性敲除*Nr5a1*的小鼠卵巢变小且原始卵泡数量减少,卵巢中存在形态异常且体积过小的卵母细胞,而这一现象也与Notch信号的失调密切相关^[35]。

1.2.2 BMP信号通路

BMPs(bone morphogenetic proteins)是多肽类生长因子,BMP信号在胚胎发育、细胞增殖、细胞分化等多种生命过程中都发挥着重要的调控作用^[36]。BMP2是一种分泌型配体,在哺乳动物原始卵泡形成前后表达,研究表明雌二醇-17 β 通过BMP2及其受体ALK2和ALK3调节原始卵泡的形成^[37]。在前期的单细胞测序研究中,我们在CBD阶段的生殖细胞中富集到*Bmpr1b*的表达。*Bmpr1b*是BMP4和BMP7的受体,应用*Bmpr1b*特异性的抑制剂LDN193189处理新生小鼠卵巢会抑制原始卵泡的形成。进一步研究表明,抑制剂处理后*Id2*的表达水平降低,这种调控作用是通过PI3K/mTOR信号通路实现的^[6]。缺失*Id2*的小鼠卵巢中原始卵泡形成出现延迟,卵泡数量减少且生育率降低。上述结果表明BMP信号介导的生殖细胞-体细胞之间的互作在原始卵泡形成中也发挥一定作用。

1.2.3 其他信号通路

KIT(receptor tyrosine kinase)及其配体KITL在人和小鼠原始卵泡的形成中发挥重要作用。在CBD前,生殖细胞表达TGF- β 超家族成员激活素。激活素通过抑制附近体细胞KITL2的表达进而抑制生殖细胞表达c-KIT。当CBD发生时,激活素的表达水平降低,KIT信号通路恢复活性进而促进原始卵泡的形成。其他参与调节原始卵泡形成的信号通路还包括JNK信号通路和

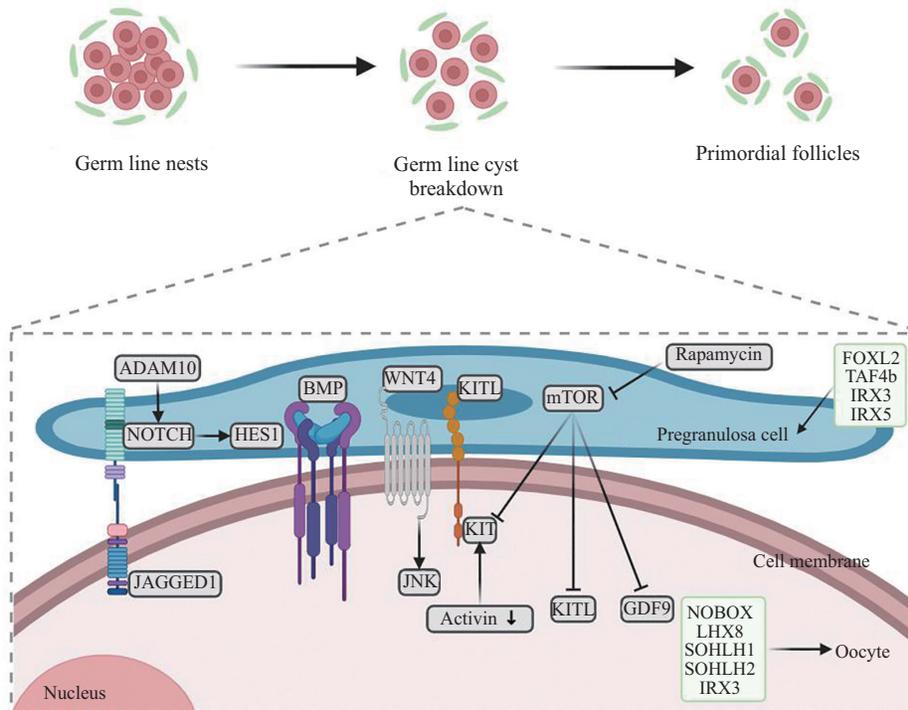


图1 原始卵泡形成相关因子及信号通路(图例使用BioRender网站制作,已获得许可)

Fig.1 Factors and signaling pathways in primordial follicle formation (image created with BioRender.com, with permission)

Rac1介导的信号通路。JNK在原始卵泡组装阶段特异性表达于卵母细胞,与前颗粒细胞中WNT4相互作用调节E-cadherin的表达参与CBD的调控,而Rac1在原始卵泡形成阶段也特异表达于生殖细胞^[38]。Rac1被认为能够结合STAT3并促进STAT3转运入核,从而激活一系列卵母细胞特异基因,如*Jagged1*、*Gdf9*、*Bmp15*等的表达^[39]。上述研究证明了从卵母细胞到前颗粒细胞的信号转导在调节原始卵泡形成中的重要作用。而前颗粒细胞中的mTOR信号通路则在调节原始卵泡的组装中发挥作用。应用mTOR信号通路抑制剂雷帕霉素(rapamycin)处理E17.5的胎鼠卵巢,其原始卵泡形成受阻,但是可逆的。抑制mTOR信号通路后,卵母细胞发育的相关因子如*Kit*、*Kitl*、*Gdf9*等的表达水平降低,同时前颗粒细胞侵入生殖细胞囊的迁移能力受阻^[40]。因此,无论是从生殖细胞到体细胞还是从体细胞到生殖细胞的信号转导在调节CBD和卵泡组装中都发挥重要作用。其他参与调控原始卵泡形成的因素可详见相关综述^[41-43](图1)。

2 原始卵泡的起始募集

原始卵泡形成后不久一直到更年期前后,会被持续募集,直至再也没有可以被募集的原始卵泡为

止,而没有被激活的原始卵泡会一直处于休眠状态,因此,原始卵泡的起始募集是一个选择性过程。有研究表明原始卵泡的激活速度会随着卵巢储备的改变而改变,在女性生殖寿命的早期,激活速度较为恒定,但当原始卵泡的储备数量达到约25 000个时,激活速度急剧加快,导致原始卵泡数量快速减少,卵巢储备迅速丢失,最终导致女性生育能力大幅下降^[44]。对于维持女性正常生殖生命和延缓衰老来说,能否在适当的时间点选择性激活原始卵泡是至关重要的。原始卵泡激活受到多种因素的调控,是细胞间信号交流的结果。目前,通过转基因小鼠模型已经发现多种细胞因子和信号通路对原始卵泡激活具有重要意义。

2.1 参与介导原始卵泡激活的因子

分泌到细胞外作用于临近细胞的信号分子被称为旁分泌信号,包括多种生长因子、细胞因子、特异性活性因子、调节性多肽等,都能调节原始卵泡的激活。NGF(nerve growth factor)主要在哺乳动物原始卵泡到次级卵泡阶段的卵母细胞和颗粒细胞中表达^[45]; *Ngf*基因敲除小鼠表现出初级和次级卵泡数量的减少^[46],而在体外卵巢培养实验中添加NGF能够提高原始卵泡的激活率^[47]。神经营养因子家族中其他成员也对原始卵泡激活有积极的促进作用,

如NT-3、GDNF等在体外培养的小鼠、大鼠和山羊卵巢中都能够促进原始卵泡激活^[48-51]。BMP15(bone morphogenetic protein 15)和GDF9(growth differentiation factor 9)对调节卵巢功能以及促进卵泡存活和发育至关重要。*Bmp15*突变的大鼠卵巢中原始卵泡无法正常发育到初级卵泡阶段^[52]; 缺失*Gdf9*的小鼠也出现类似表型^[53], 而应用200 ng/mL的GDF9对山羊的原始卵泡进行刺激可以促使其发育到后续阶段^[54]。参与炎症反应的细胞因子也可能调控原始卵泡激活。研究发现高脂饮食可能通过炎症反应减少小鼠的原始卵泡数量^[55]。使用脂多糖灌胃导致卵巢内M1巨噬细胞浸润并分泌IL-6、IL-8和TNF- α , 这些炎性因子通过激活STAT3信号促进原始卵泡激活, 最终导致原始卵泡池的加速消耗^[56]。

卵巢产生的激素对于原始卵泡库的激活也具有调控作用。雄激素是一类类固醇化合物, 对卵巢中原始卵泡激活的影响主要是促进作用, 在小鼠体外卵巢培养实验中, 雄激素受体拮抗剂处理的小鼠卵巢的卵泡激活和生长速度都会减慢^[57]。

因此, 原始卵泡的激活过程是一个在局部产生的各种生长因子、细胞因子以及激素等的正向和负向作用的综合结果。

2.2 原始卵泡激活的信号网

2.2.1 PI3K-AKT信号通路

PI3Ks(phosphatidylinositol 3-kinase)是一种脂质和蛋白激酶家族, 参与调控多种细胞功能, 分为3类, 目前研究最广泛的是能被细胞表面受体激活的I型PI3K, 其中IA型PI3K是由催化亚基p110和调节亚基p85所组成的二聚体蛋白, 具有类脂激酶和蛋白激酶的双重活性。AKT是PI3K的关键下游靶点, 在细胞质中, PI3K磷酸化磷脂酰肌醇环的3'-羟基位置, 产生磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, PIP3), PIP3通过磷酸化将AKT募集到细胞膜, 该过程受到磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)和含SH2的肌醇5-磷酸酶(SH2-containing inositol phosphatase 1, SHIP)的负调控。数十年来, 研究发现IA型PI3K和AKT所组成的信号通路与多种人类疾病的发生发展密切相关^[58-60], 而该信号通路中一系列关键分子的基因敲除小鼠实验也进一步证明了其在调节原始卵泡激活中的关键作用。

PDK1(3-phosphoinositide-dependent protein ki-

nase 1)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是PI3K/AKT信号通路上的重要节点, 可以与PI3K产生的PIP3结合激活AKT, 其还可以作为主要激酶在磷酸化后激活AGC家族的其他蛋白激酶, 如: p70S6K1、PKC等。卵母细胞特异性缺失*Pdk1*会导致小鼠出现卵巢早衰且完全不育的表型^[61]。机制研究表明, PDK1的缺失导致AKT信号被抑制, S6K1也不能被激活, rpS6的磷酸化水平大大下降, 原始卵泡因为无法激活和存活而大量丢失。因此, 卵母细胞中的PDK1-AKT-S6K1-rpS6信号通路在原始卵泡库的维持中发挥重要作用。CDC42(cell division cycle 42)是Rho亚家族的一种小GTP酶^[62]。CDC42是卵母细胞成熟的关键调控因子, 也是PI3K信号通路的上游因子, 可以通过结合p110- β 蛋白来调节PI3K信号, 从而调控原始卵泡的激活^[63]; 小鼠体外卵巢培养实验还发现短期应用CDC42激活剂可以增加激活原始卵泡的数量^[64]。

2.2.2 mTOR信号通路

哺乳动物mTOR(mechanistic target of rapamycin)是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是PIKK(phosphatidylinositol kinase-related kinase)蛋白质家族成员, 也是AKT最重要的下游通路之一。mTOR能够组装成两个功能不同的复合物: mTORC1和mTORC2。AKT在被mTORC2磷酸化后, 才能充分发挥活性; AKT信号能够激活mTORC1中的mTOR, 并继续磷酸化核糖体S6激酶(S6K1和S6K2)以及eIF4E结合蛋白(4EBP1和4EBP2), 从而促进蛋白质合成, 最终促进细胞存活、生长和增殖。在哺乳动物中, mTORC1的活性受到TSC1和TSC2的联合负调控, TSC1-TSC2复合物通过位于TSC2中的GTPase激活蛋白结构域抑制mTORC1的激活, 而TSC1在其中发挥稳定TSC2的功能来防止TSC2发生泛素化和降解的功能^[65]。mTORC1信号通路在前颗粒细胞中发挥重要作用。在前颗粒细胞中特异性敲除mTORC1复合物组分*Rptor*, 能够阻止前颗粒细胞向颗粒细胞的分化, 卵母细胞处于休眠状态并最终导致死亡。而在前颗粒细胞中特异性敲除*Tsc1*并激活mTOR信号通路后, 则会促进颗粒细胞的分化, 表现为原始卵泡过度激活和卵巢早衰^[66]。进一步研究表明, 前颗粒细胞中mTORC1通过KITL-KIT激活卵母细胞中的PI3K信号通路唤醒卵母细胞进入生长发育阶段。在人类卵巢早衰的患者中, 检测到5种TSC2的变异分别影响TSC2与TSC1的相互作用、GTP-Rheb的水解以及TSC2的蛋白稳定性, 说明mTORC1

信号通路异常导致原始卵泡库维持和激活的失衡是人类卵巢早衰的发病机制之一^[67]。此外,当使用MAPK3/1抑制剂U0126培养新生小鼠卵巢时,原始卵泡激活被抑制,生长卵泡数量也随之减少,U0126的处理显著降低mTOR信号通路TSC2、S6K1、rps6等的磷酸化水平,说明MAPK3/1信号通路是通过mTORC1信号参与调控原始卵泡的激活^[68]。

其他参与调节mTOR信号通路的分子,SIRT1(sirtuin1)是依赖NAD⁺的Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶HDAC6(histone deacetylase 6)中的一员,在细胞增殖、凋亡、衰老等过程中发挥重要作用。SIRT1在小鼠原始卵泡前颗粒细胞和卵母细胞细胞核中表达。在小鼠中敲入*Sirt1*,可以增加卵巢储备并提高生育率^[69];而敲低前颗粒细胞或卵母细胞中的*Sirt1*则会抑制小鼠原始卵泡激活,并且颗粒细胞和卵母细胞中的SIRT1在激活过程中协同发挥作用,但与SIRT1本身的去乙酰化酶特性无关,SIRT1主要通过mTOR信号通路促进原始卵泡激活^[70]。HDAC6主要在卵母细胞和颗粒细胞细胞质中表达。原始卵泡的激活与否可能和HDAC6的表达量有关,过表达*Hdac6*会延迟原始卵泡激活,而抑制或敲低*Hdac6*则会加速原始卵泡激活,导致卵巢早衰^[71]。抑制HDAC6会使卵泡中mTOR的表达水平和PI3K的活性上调,因此,HDAC6可能是通过mTOR信号通路维持原始卵泡激活和休眠之间的平衡^[71]。LIN28a是一种保守的RNA结合蛋白,在人类原始生殖细胞中表达。长期过表达*Lin28a*会促进卵母细胞中*LRP5*启动子的转录,激活mTOR信号通路,导致原始卵泡大量异常激活,卵巢储备提前耗竭,出现卵巢早衰^[72]。LIN28a的适度表达对于生殖能力的保存至关重要,但在人类中暂时还没有研究。

2.2.3 KIT-KITL信号通路 KIT是生长因子受体家族的一员,属于Ⅲ型跨膜受体酪氨酸激酶,具有内在的酪氨酸激酶活性^[73]。KITL是KIT蛋白的配体,又称干细胞因子(stem cell factor, SCF)或肥大细胞生长因子(mast cell growth factor, MCGF)。已有许多研究证明KIT受体表达及其与KITL的相互作用对胚胎性腺原始生殖细胞的附着、增殖、迁移和存活非常重要,还与原始卵泡激活及生长发育有着密切关系^[74]。KIT在原始卵泡的卵母细胞中高表达,KITL由原始卵泡的颗粒细胞产生。在体外使用血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)培养新生大鼠的原始卵泡发现VIP能够通过上调KITL的表达来促使原

始卵泡激活和生长发育^[75]。颗粒细胞中mTORC1信号通路激活原始卵泡的机制就是通过促进KITL的表达,与卵母细胞中KIT相互作用激活PI3K-AKT信号通路而实现的。

2.2.4 JAK-STAT信号通路 JAK-STAT信号通路主要由接收信号的酪氨酸激酶相关受体、传递信号的酪氨酸激酶和产生效应的转录因子组成。当细胞因子或生长因子与受体结合后,JAK被磷酸化激活,从而磷酸化下游靶蛋白的酪氨酸残基,招募并磷酸化STAT,使其以二聚体形式进入细胞核内结合靶基因,对下游基因进行转录调控。JAK-STAT信号通路在细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学过程中发挥作用。LIF(LIF interleukin 6 family cytokine)已被证明是调节原始卵泡激活的因子之一。使用LIF体外培养卵巢发现其中STAT3和SOCS4的表达水平显著升高,并确定CLC、PCBP1和MDH1为SOCS4的作用靶点^[76]。JAK1(janus kinase 1)在早期卵巢的原始卵泡和初级卵泡的颗粒细胞中有表达,抑制JAK1活性导致STAT3和SOCS4上调,原始卵泡被加速激活,上述研究表明颗粒细胞中JAK-STAT信号通路在维持卵泡储备调节原始卵泡激活中的重要作用^[77]。

2.3 参与介导原始卵泡休眠的因子及信号网

原始卵泡的休眠是所处环境发生持续性的抑制所导致的相对静止状态,在过去数十年间,通过对转基因小鼠模型的研究,维持原始卵泡休眠的相关因子和信号通路逐渐被发现。

TGF- β (transforming growth factor- β)在维持原始卵泡的休眠状态中发挥作用。应用TGF- β 受体抑制剂SD208处理新生小鼠卵巢能够促进原始卵泡的激活以及颗粒细胞的增殖^[78]。AMH(anti-müllerian hormone)是TGF- β 超家族的一员,卵巢中卵泡的颗粒细胞能够产生并分泌AMH,是原始卵泡休眠的调控因子。在缺失*Amh*的雌性小鼠中,原始卵泡库因被过度激活而提前耗竭^[79];应用AMH在体外培养新生小鼠卵巢,结果表明短时间AMH培养会导致卵巢中生长卵泡数量减少近半,说明AMH对维持原始卵泡休眠有重要作用,而在应用FSH和AMH联合培养的卵泡发育比单独用AMH培养的卵泡要差^[80],说明AMH不仅可以维持原始卵泡的休眠状态,还可以降低卵泡对FSH的敏感性。FOXL2(forkhead box L2)在小鼠卵巢的颗粒细胞中表达。在缺失*Foxl2*的雌性小鼠中,几乎所有原始卵泡中的卵母细胞开始提

前生长, 出生后8周时, 原始卵泡库提前耗竭, 结果表明前颗粒细胞中的FOXO3通过抑制卵母细胞生长的起始来维持原始卵泡休眠^[23]。

在PI3K-AKT信号通路中几个关键分子的基因敲除小鼠实验也证明了其在调节原始卵泡休眠中的关键作用。FOXO3(forkhead box O3), 又称FOXO3a, 是第一个通过基因敲除实验验证参与维持原始卵泡休眠的转录因子。*Foxo3a*缺失会导致原始卵泡库的过度激活和提前耗竭, 敲除小鼠表现为卵巢早衰而不孕的表型^[81]。PTEN(phosphatase and tensin homolog), 又称MMAC1, 是PI3K信号通路的抑制分子。应用Gdf9-Cre转基因小鼠特异性敲除卵母细胞中的*Pten*基因后, 小鼠表现为原始卵泡库中所有原始卵泡异常激活, 出现卵巢早衰的表型, 而这种异常激活与PTEN缺失导致PI3K信号通路的过度激活有关^[82]。应用Vasa-Cre转基因小鼠特异性敲除生殖细胞中的*Pten*基因后, 小鼠也出现类似表型, 结果表明PTEN对于维持原始卵泡休眠至关重要^[83]。进一步研究表明, *Pten*和*Foxo3*双敲除小鼠中的原始卵泡的激活情况并没有比单个基因敲除小鼠表现得更剧烈, 所以PTEN和FOXO3不存在协同作用, 并且体外实验证实了FOXO3是PTEN的下游因子^[83]。因此, 上述研究揭示了卵母细胞中PTEN-PI3K-AKT-FOXO3信号通路在维持原始卵泡休眠中的重要作用。

应用Gdf9-Cre转基因小鼠特异性敲除卵母细胞中的*Tsc1*或*Tsc2*基因后, 小鼠均表现为原始卵泡过度激活、原始卵泡库提前耗竭和卵巢早衰的表型, 结果表明TSC1-TSC2复合物能够维持原始卵泡休眠, 这与mTORC1信号的异常升高和S6K1-rpS6信号的异常激活有关。因此, TSC1和TSC2通过抑制mTORC1的活性起到维持原始卵泡激活和休眠的作用^[84]。

CDK抑制蛋白(CDK inhibitor, CKI)能够负调控细胞周期进程, 其中p27(cyclin dependent kinase inhibitor 1B)属于p21家族, 对cyclin和CDK复合物具有抑制作用。在小鼠原始卵泡形成之前, p27只在体细胞中表达; 出生后4天, p27开始在卵母细胞核和颗粒细胞中表达; 出生后23天, p27仅在颗粒细胞中表达^[85]; 可见, 随着卵泡的生长发育, p27在卵母细胞中的表达量逐渐减少。p27对于维持卵泡休眠及调控卵巢发育至关重要, 敲除p27的小鼠卵巢中卵泡数量增加, 主要是原始卵泡被大量激活。研究发现在缺失p27的小鼠中,

p27的靶点CDK2-cyclin A/E1相关的激酶活性显著升高, 但是两者是否存在必然联系还需要进一步确认^[85]。已知p27和FOXO3a都是原始卵泡休眠的重要调控因子, 在同时敲除p27和*Foxo3a*的小鼠中, 原始卵泡异常激活的情况更为严重, 说明p27维持原始卵泡休眠的机制与FOXO3a维持原始卵泡休眠的机制是不同的, 但具体机制还有待研究^[86]。

综上所述, 转基因小鼠的广泛应用极大地促进了原始卵泡激活分子机制的研究。在调节原始卵泡激活过程中, 各主要信号通路的分子之间并不是简单的线性关系, 通过联合基因敲除实验表明, 这些信号通路在调节原始卵泡激活过程中表现为功能的叠加性或协同性。如PTEN-PI3K-AKT-FOXO3信号通路同TSC-mTORC1-S6K1-RPS6信号通路就表现为功能的叠加性。同单个基因敲除的小鼠相比, *Tsc*和*Pten*双重敲除的小鼠其卵巢中原始卵泡的消耗速度更快。此外, 同时缺失*Foxo3*和p27的小鼠其原始卵泡激活的速度也会变得更快。在前颗粒细胞中mTOR信号通路是促进颗粒细胞分化、维持原始卵泡存活和激活原始卵泡的关键信号通路, 而MAPK主要通过mTOR信号通路参与调节颗粒细胞功能。关于JAK-STAT信号通路与其他信号通路的关系还有待于进一步研究。因此, 在调节原始卵泡激活的过程中, 前颗粒细胞与卵母细胞之间的信号通路构成复杂的信号网络, 相互调节共同参与原始卵泡库的维持和起始募集(图2)。

2.4 原始卵泡的选择性激活

据研究统计, 新生儿的卵巢中有约100万个原始卵泡, 青春期减少至约25万个, 到更年期时仅存约1000个^[87], 其中大部分皆会因闭锁而消失。在雌性哺乳动物中, 仅有不到1%的原始卵泡最终成为可排出的卵子。值得注意的是在这个循环往复的过程中, 原始卵泡始终只有少部分被激活, 而剩下的都处于休眠状态。根据女性出生的卵泡数以及女性的绝经年龄, 可以计算出生命各阶段原始卵泡的募集速度, 而根据某阶段原始卵泡的数量也可以推算绝经年龄, 然而关于原始卵泡募集的速度以及在正常生理状态下是如何进行非随机、有选择性的激活的调控机制却并不清楚^[88]。

实验室先期研究表明, 卵巢局部手术损伤只会激活切口部位的原始卵泡, 而非损伤侧的原始卵泡仍然处于休眠状态^[89]。损伤局部的急性炎症反应

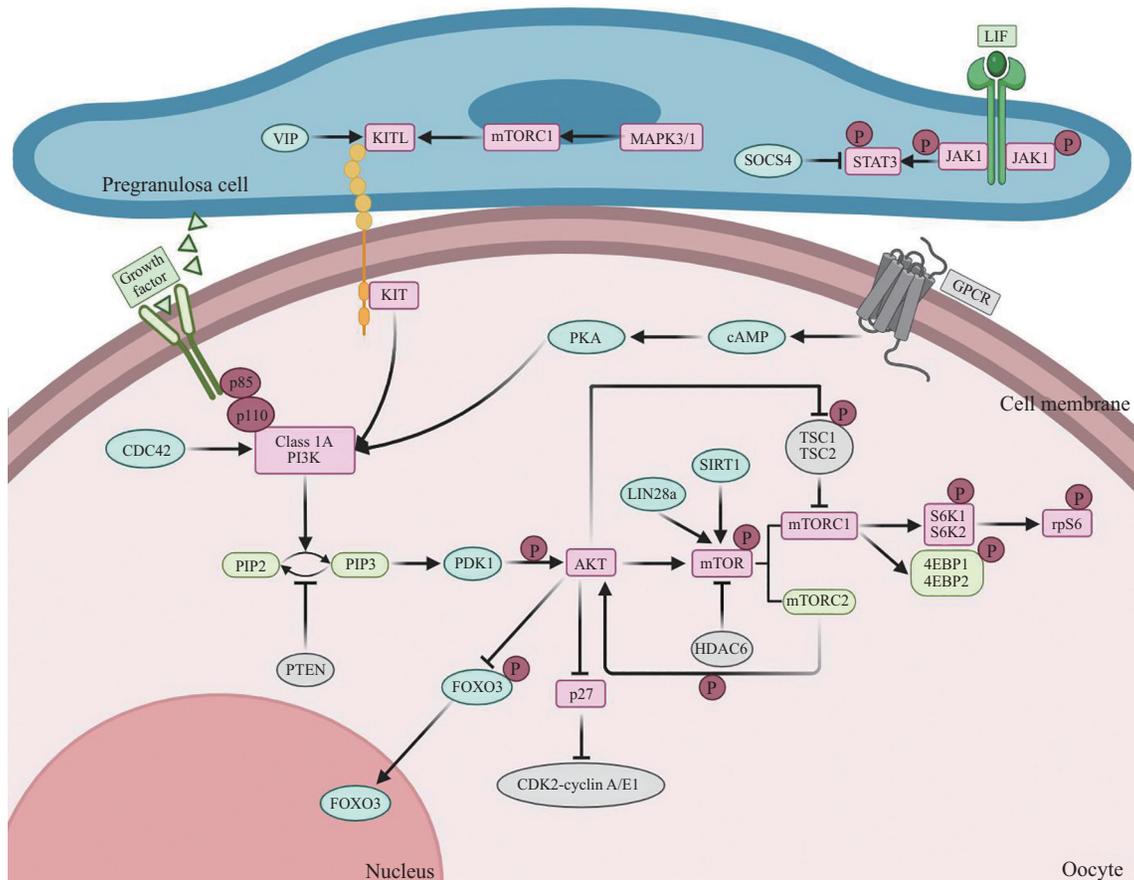


图2 原始卵泡激活相关信号通路(图例使用BioRender网站制作, 已获得许可)

Fig.2 Signaling pathways in primordial follicle activation (image created with BioRender.com, with permission)

引起NGF表达升高,通过mTOR信号通路调控由前颗粒细胞到卵母细胞的激活。这是一种微环境信号变化影响原始卵泡选择性激活的新发现。当使用mTOR抑制剂雷帕霉素或NGF抑制剂K252a时,损伤所诱导的原始卵泡激活能够被阻断,因此,阻断mTOR信号通路或NGF的功能可能是未来卵巢手术患者保留生育力的方式之一。排卵过程一直被认为是一种局部的急性炎性过程,在随后的研究中,我们发现超数排卵的小鼠卵巢中原始卵泡会被加速激活,而在正常生理状态下则是位于排卵点附近的原始卵泡被优先激活。进一步的实验结果表明,这与排卵点局部的M1型巨噬细胞浸润有关^[90]。因此,我们提出了“初情期后的周期性排卵是原始卵泡选择性激活的诱发因素”这一科学假说,并且这种由于炎性细胞或炎性因子的累积导致的卵巢慢性无菌性炎症环境会加速原始卵泡激活和消耗,最终导致卵巢储备的耗竭和卵巢衰老。最近有研究表明在小鼠中抑制排卵,也能延缓卵巢衰老,即验证了排卵过程对

于原始卵泡募集的调控^[91]。ZHANG等^[71]的研究则发现了HDAC6表达水平强弱同FOXO3的核-胞质定位变化一样可以用于标记原始卵泡是否处于激活状态。处于激活状态的原始卵泡无论前颗粒细胞还是卵母细胞中HDAC6表达水平都非常低,而相反则意味着原始卵泡处于休眠状态。抑制HDAC6能够促进更多的原始卵泡进入起始募集阶段,这与HDAC6在前颗粒细胞中通过调节mTOR-KITL信号有关。至于卵母细胞中FOXO3与HDAC6在调节原始卵泡激活过程中的相互作用关系还有待于进一步研究,这也可能代表着原始卵泡维持休眠状态的一种双重保障机制(图3)。

3 女性生育力保存策略

随着世界范围内的不孕症比例越来越高,各种辅助生殖手段应运而生,尽管体外受精(*in vitro fertilization*, IVF)试管婴儿技术实现了领域内里程碑式的突破,但是与年龄相关的不孕症仍然是最难解决

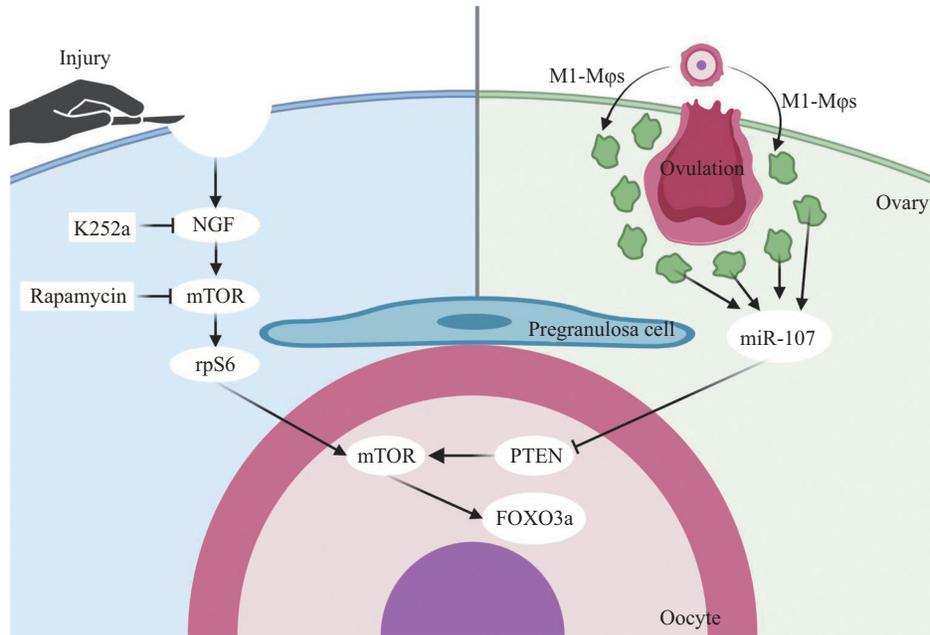


图3 原始卵泡选择性激活示意图(图例使用BioRender网站制作, 已获得许可)

Fig.3 Schematic diagram of selective activation of primordial follicles (image created with BioRender.com, with permission)

的问题。影响原始卵泡库的因素有许多,如:遗传因素、年龄增长、激素紊乱、肿瘤治疗中的放化疗、不可避免的卵巢手术等。原始卵泡库的提早耗竭会导致卵巢早衰等卵巢相关疾病,也会使女性的生殖生命提前结束,还会对女性身心健康造成多重危害,这样的情况不止会在患病女性中发生,正常女性随着时间的推移也都会面临卵巢衰老的问题,因此,如何较好地保存女性生育力是数十年来研究者们所关心的问题。目前,激素替代疗法是缓解更年期症状的主要方法,但是这种方法会增加罹患乳腺癌、卵巢癌等疾病的风险,而卵巢组织及配子冻存等方法还没有大规模开展,因此,本节主要聚焦于原始卵泡体外激活这项新技术以及一些保护卵巢储备的方法与药物。

3.1 原始卵泡体外激活(*in vitro* activation of primordial follicles, IVA)

2010年,LI等^[92]使用PTEN抑制剂和PI3K激活剂建立了IVA的技术,这项技术是指在体外使用信号通路激活剂处理卵巢组织来激活卵巢皮质中的原始卵泡,再将组织移植回体内促进原始卵泡生长发育的技术。这项技术可用于帮助由于卵巢早衰、卵巢储备低下、卵巢低反应等无法得到成熟且质量好的卵子的女性得到后代。KAWAMURA等^[93]随后改进了IVA技术,并报道了组织大小改变会通过Hippo信号

通路促进原始卵泡激活和生长发育。该团队随后运用IVA技术针对10名POI患者冷冻组织进行IVA,也有1例患者成功分娩1名正常婴儿^[94]。ZHAI等^[95]改进了激活方法,不再将组织玻璃化冷冻,而是直接激活后移植,最终在14名POI患者中使1例患者成功分娩1名健康婴儿,这也是我国首例IVA后分娩的婴儿。SUN等^[96]在2015年引入mTOR信号通路的激活剂磷脂酸和心得安,发现这两种激活剂分别和联合应用均能够激活人和小鼠的原始卵泡,并且体内注射后能够提高老年小鼠的生育能力。由于PI3K和mTOR信号通路的协同作用,当联合应用PI3K激活剂740Y-P和mTOR激活剂磷脂酸处理后,研究人员发现具有更高的原始卵泡的激活效率。基于上述实验结果,ZHAI等^[97]在2021年开发了一种更快速的原始卵泡体外激活技术并将其应用于临床。该方案使用PI3K激活剂740Y-P和mTORC1激活剂磷脂酸联用孵育卵巢皮质1h后通过腹腔镜手术立即移植回患者体内,整个手术过程仅需要一次腹腔镜手术且可以在3h内完成,最终在15名POI患者中使2例患者分别分娩1名正常婴儿。与以往的48h处理方案相比,新的IVA技术由于体外处理时间的缩短,只需要进行一次腹腔镜手术,并且卵巢组织不需要冻存也不需要切成过小的碎片,只要将组织处理成5~7mm的皮质片即可。因此,这大大节约了患者的医疗成本,更具临

床推广的意义。此外,依据Hippo信号通路在激活原始卵泡中的作用,ZHANG等^[98]在2019年通过单次腹腔镜对卵巢进行划痕处理以促进原始卵泡的激活和发育,这种方式避免了多次腹腔镜对身体造成的不良影响,也避免了PTEN抑制剂和AKT激活剂的使用对患者及其后代可能造成的后遗症,但是这种方法可能只适用于卵巢中有相当数量原始卵泡残留的患者,其对于原始卵泡的激活效率还有待提高。

3.2 保护卵巢储备与延缓卵巢衰老

在女性衰老的过程中,生育能力不可避免地快速下降,卵巢储备和卵母细胞质量对于维持女性的生殖能力至关重要。如前所述,维持卵巢中原始卵泡激活速率的恒定或选择性激活原始卵泡都有助于保持卵巢储备,通过干预与原始卵泡激活有关的细胞因子或信号通路有可能能够改善卵巢储备。卵母细胞质量已被证明与DNA损伤、长期暴露于氧化应激等因素有关。减数分裂过程中正确的纺锤体组装保证了染色体的均匀分布和分离,进一步促进了早期胚胎发育^[99-100],而染色体的错误分离(包括姐妹染色单体的反向分离或过早分离或减数分裂I期不分离),即非整倍体,会导致严重的不良生殖事件,如流产或新生儿智力缺陷等^[101]。有研究将老年女性的整倍体正常卵母细胞用于体外受精,获得了与年轻女性相似的良好植入情况,结果说明非整倍体才是女性生育力下降的原因^[102]。

3.2.1 雷帕霉素(rapamycin) 雷帕霉素是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶抑制剂,作用于mTORC1复合物,对卵巢功能具有保护作用^[103]。运用雷帕霉素能够有效挽救前述卵母细胞特异性敲除*Tsc1*和*Pten*的小鼠的原始卵泡过早激活和卵巢早衰^[104];另外一项大鼠的研究发现长期腹腔注射雷帕霉素可以有效抑制原始卵泡激活和卵泡闭锁,有助于维持原始卵泡库,还能够延缓卵巢衰老^[105]。然而长期注射雷帕霉素会可逆性地阻碍卵巢功能,如抑制卵泡的发育成熟、导致发情周期紊乱以及不孕等。为了降低雷帕霉素的副作用,在实验室先前的研究中对8周龄和8月龄的小鼠分别服用2周雷帕霉素,小鼠会出现暂时性的卵巢功能紊乱,但在2个月左右恢复正常,并且无论是青年还是中年小鼠在衰老的过程中都表现为生育力的延长,上述结果表明短暂的雷帕霉素处理同样能够延缓卵巢衰老^[106]。此外,短期2次注射雷帕霉素的治疗还可以有效改善卵巢过度刺激综合征^[107]。

雷帕霉素可以通过PI3K-AKT-mTOR信号通路阻止化疗药物对卵巢造成的损伤,改善原始卵泡库的耗竭程度^[108]。因此,雷帕霉素可以作为候选药物用于保护卵巢储备延缓卵巢衰老或防止放疗对于原始卵泡造成损伤。

3.2.2 卡路里限制(caloric restriction) 肥胖对女性生殖健康有重大影响,会引起月经周期紊乱、多囊卵巢综合征、不孕不育风险增加等。卡路里限制能够保护卵巢储备并延缓生殖衰老,但需要注意的是并非越高的卡路里限制就是越有益的。有研究表明相比于10%卡路里限制的小鼠,30%卡路里限制的小鼠表现出更剧烈的体重增加,在10%卡路里限制的小鼠中,原始卵泡数量较多,而在30%卡路里限制的小鼠中,初级卵泡数量更多,总卵泡密度大于10%卡路里限制小鼠,说明10%卡路里限制或许对原始卵泡库储备更有益,而30%卡路里限制或许对原始卵泡激活和后续发育更有益,两种不同程度的卡路里限制均能够一定程度上提高生育率^[109]。还有研究发现妊娠后半期卡路里限制的母鼠的雌性后代体重增加且卵巢中原始卵泡数量减少,是对照组的约60%,因此,妊娠后半期卡路里限制可能会缩短雌性后代的生殖寿命^[110],所以在适当的时间段以适当的程度进行卡路里限制才能够维持原始卵泡激活与休眠之间的平衡,从而确保卵泡以正常的速度发育成熟。Sirtuins家族,又称SIRT家族,是依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的III类组蛋白去乙酰化酶,已有研究表明SIRT1能够通过TSC1/TSC2复合物负调控mTOR信号通路^[111]。在卵巢衰老的相关研究中,卡路里限制通过增加SIRT1的表达水平改善卵巢储备并延长生殖寿命。*Sirt1*转基因小鼠和使用SIRT1激活剂白藜芦醇的研究也表明实验组小鼠会出现类似卡路里限制的表型,以上结果都验证了SIRT1对于延缓卵巢衰老非常重要。一项对大鼠进行为期10周的卡路里限制研究发现卵巢中原始卵泡的数量显著增加,p70S6K信号水平升高,而使用SIRT1特异性激活剂SRT1720治疗高脂饮食诱导的肥胖小鼠能够成功增加原始卵泡的数量,还能够改善紊乱的发情周期^[112]。研究发现SIRT1通过负调控mTOR信号降低了mTOR蛋白的表达水平,而卡路里限制很有可能是通过上调SIRT1信号维持原始卵泡库的。在建立小鼠模型模拟化疗后卵巢毒性损伤的过程中发现卡路里限制依旧可以保护卵巢储备,但作用机制可能

是卡路里限制通过下调SIRT1信号降低了p53的表达水平, 导致p53介导的细胞凋亡被抑制^[113]。综上所述, 适当的卡路里限制对于延缓卵巢衰老和延长生殖寿命具有积极作用, 但是正确利用到人类女性的生殖保护中还需要未来更多的探索。

3.2.3 二甲双胍(metformin) 二甲双胍最初是一种治疗糖尿病的药物, 可以通过作用于多种因子和信号通路发挥作用, 如降低IGF-1信号强度、抑制mTOR信号通路、激活AMPK信号通路等, 在年龄相关性疾病中扮演重要角色, 可以减轻先兆子痫、保护卵巢储备并延缓卵巢衰老。给小鼠服用半年的二甲双胍后, 发现二甲双胍组小鼠的正常发情周期比例高于对照组, 卵巢中原始卵泡和初级卵泡的数量均显著增加, 说明二甲双胍改善了卵巢内分泌功能, 能够保护卵巢中的原始卵泡库并延缓卵巢衰老, 其作用机制主要是通过激活SIRT1并降低氧化损伤来实现的^[114]。二甲双胍可以缓解因使用恶性肿瘤治疗药物卡铂而导致的卵巢储备耗竭^[115]。有研究表明二甲双胍能够缓解高脂饮食所导致的小鼠总体重和性腺组织重量的增加, 能够有效改善卵巢内分泌功能, 在一定程度上恢复正常排卵, 进而使高脂饮食小鼠正常怀孕并产仔。此外, 二甲双胍在治疗多囊卵巢综合征、改善体外受精结局等方面也都具有一定促进作用, 不过目前相关研究还相对较少, 其安全性和效率有待验证和提高。

3.2.4 褪黑素(melatonin) *N*-乙酰基-5-甲氧基色胺, 又称褪黑素, 是哺乳动物和人类松果体产生的一种吲哚胺类神经递质。近年来, 褪黑素强大的抗氧化能力使其在抗衰老方面的作用得到了越来越多的关注。有研究表明褪黑素能够延缓雌性大鼠生殖衰老, 但是卵巢中原始卵泡的数量没有差异。长期(12个月)外源性补充褪黑素能够增加总卵泡数量, 通过减少氧自由基诱导的损伤显著提高卵母细胞的质量^[116]。除了抗氧化作用外, 褪黑素的作用机制还可能与SIRT家族因子的活性、自噬等多种途径有关。另一项研究发现褪黑素通过抑制PI3K-AKT信号通路来抑制原始卵泡激活和后续生长发育^[117], 还有研究表明褪黑素可以通过抑制ROS-YTHDF2-MAP2K4/MAP4K4-NF- κ B途径来缓解卵巢衰老, 但是是否存在其他因子或者信号通路协同发挥作用还未可知^[118]。目前, 褪黑素在人类女性中已有部分应用, 可以提高试管婴儿的受精成功率并改善更年期

妇女的促卵泡激素水平。

3.2.5 间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC) 及其产生的外泌体(exosomes, Exo) MSC是一类具有自我更新和多向分化能力的成体干细胞, 广泛存在于脂肪、结缔组织、脐带、胎盘和羊膜等组织中。近年来, 国内外研究表明, 在动物模型中将间充质干细胞移植至卵巢内可以恢复卵巢功能并改善生育能力^[119-122]。相关方向的临床试验也已开始探索脐带间充质干细胞在保护生育功能方面的应用。目前, MSC在临床研究的适应症已经超过130种, 临床治疗的安全性和有效性已得到了初步验证。截至2020年底, 世界范围内以MSC作为移植细胞, 在世界卫生组织国际临床试验注册平台上注册的已结束或正在进行的临床试验约1 200例左右, 而针对DOR人群的临床研究, 目前已有18项临床注册已经启动或在研中。因此动物实验或临床研究都显现出间充质干细胞在改善卵巢功能减退、提高女性生育力方面的良好前景与潜力。MSC的生物治疗作用已经被广泛研究, 但其机制仍然不完全明确。目前, 越来越多的研究者认为间充质干细胞主要是通过释放细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)来发挥作用的。外泌体(Exo)是细胞外囊泡中被研究得最广泛的一种亚群, 由PAN和JOHNSTONE等^[123]于1983年首次发现, 这是一种具有膜结构的细胞外小囊泡, 其直径介于40 nm至150 nm之间。研究表明, 外泌体可以被大多数细胞所分泌, 并在大多数体液(如血液、尿液、脑脊液、腹水、卵泡液、羊水、关节液等)中被检测到。外泌体的表面和内部含有大量的蛋白质、脂质、核酸等, 而不同来源的外泌体其内部成分也不相同。MSC来源的外泌体(MSC-exos)被认为拥有广泛的治疗能力, 包括在创伤修复和组织重建、心血管疾病、脑损伤、炎症等方面。作为一种无细胞(cell-free)的治疗方式, 外泌体有较短的半衰期, 可以更好地被受体细胞吸收。此外, MSC-exos可以冻存储备, 不影响其生物活性, 也具有较低的免疫原性和致瘤性风险, 临床使用安全性较高。MSC-exos已经在多种类型的疾病中显示出令人鼓舞的治疗效果, 包括新型冠状病毒肺炎、关节炎、心脏疾病、皮肤再生等^[124-125]。关于MSC-exos在化疗药物引起的卵巢功能损伤模型中发挥的抗凋亡作用已有报道。YANG等^[126]将人脐带来源的间充质干细胞的外泌体(HucMSC-exos)与新生小鼠卵巢进行体外培养,

HucMSC-exos能够特异富集于卵母细胞中并激活原始卵泡。将HucMSC-exos注射到老年小鼠的卵巢包囊内,发现老年小鼠的生育能力被挽救,卵母细胞数量和质量均有提高。这一作用是由HucMSC-exos携带的miRNA(miR-146a-5p/miR-21-5p)通过PI3K-mTOR信号通路激活原始卵泡实现的。后续研究结果表明,miR-21-5p靶向抑制PTEN调节细胞凋亡是HucMSC-exos发挥作用的潜在分子机制。棕色脂肪来源的外泌体(BAT-exos)也被证明能够延缓卵巢衰老,体内和体外实验均证实BAT-exos能够提高卵母细胞质量,抑制氧化应激反应,降低炎症因子的表达水平,减少氧自由基的产生。需要注意的是,BAT-exos不仅在卵巢中具有抗衰老功能,还在全身多器官改善了整体代谢情况^[127]。综上所述,MSC-exo在调节卵巢储备、改善卵巢功能方面是一种非常具有潜力和前景的方法,然而,由于外泌体的异质性以及分离纯化的难度限制了其临床应用。未来,标准化工业化生产体系的逐步建立将促进MSC-exo在改善女性卵巢功能方面临床应用的发展。

4 总结与展望

原始卵泡库的建立和维持是决定女性生育力的关键因素。以前的研究发现了激素、各种生长因子和细胞因子通过内分泌、旁分泌和自分泌的方式在此过程中发挥作用。随着转基因小鼠尤其是细胞特异性转基因小鼠模型的广泛应用,研究人员鉴别出了一系列在原始卵泡形成和激活中发挥作用的关键因子和信号通路。单细胞测序技术和空间转录组学的迅速发展为研究原始卵泡形成和激活过程中单个细胞基因表达的动态变化以及细胞与细胞之间的交互作用机制奠定了基础。比如基质细胞和免疫细胞同其他体细胞相互交流在促进颗粒细胞分化、调节原始卵泡形成和激活中的作用。虽然小鼠中一些指导原始卵泡形成和激活的关键基因也是人POI的致病基因,然而并不是所有POI致病基因都能在小鼠模型中得到验证。与小鼠相比,人类卵巢的皮质区域和髓质区域的区分更为明显,皮质区域的细胞组分或者是其他因素对于原始卵泡库的调节是否会与小鼠有所不同?未来非人灵长类的研究结合人类卵巢样本的单细胞测序或空间转录组分析将有助于解决上述关键问题。此外,关于前颗粒细胞和生殖细胞如何协同分化相互识别形成原始卵泡的机制并不

清晰。关于原始卵泡激活也尚有许多问题亟待解决,如:在生理状态下,为什么每次启动募集只有部分原始卵泡被激活?卵巢局部环境如何调控周围原始卵泡进行选择性激活?什么因素导致原始卵泡激活速度的改变和卵巢衰老?原始卵泡激活后,卵母细胞如何与周围的前颗粒细胞相互作用发育为初级卵泡?在临床应用上,IVA技术的建立可以帮助卵巢储备低下、POI患者获得后代,然而受原始卵泡数目的限制,成功率并不高,其临床治疗的效果尚需大样本量的临床试验加以验证。间充质干细胞以及产生的外泌体在治疗女性卵巢功能障碍尤其是高龄女性生育力低下方面更具优势。未来随着关于原始卵泡库建立和维持机制的研究,我们必将发明更多的技术或手段用于保护卵巢储备、提高女性的生育力并延缓卵巢衰老。

参考文献 (References)

- [1] OKTEM O, OKTAY K. The ovary: anatomy and function throughout human life [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1127: 1-9.
- [2] ZHANG H, ADHIKARI D, ZHENG W, et al. Combating ovarian aging depends on the use of existing ovarian follicles, not on putative oogonial stem cells [J]. *Reproduction*, 2013, 146(6): R229-R33.
- [3] CHON S J, UMAIR Z, YOON M S. Premature ovarian insufficiency: past, present, and future [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.672890.
- [4] CHIQUOINE A D. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo [J]. *Anat Rec*, 1954, 118(2): 135-46.
- [5] LEI L, SPRADLING A C. Mouse oocytes differentiate through organelle enrichment from sister cyst germ cells [J]. *Science*, 2016, 352(6281): 95-9.
- [6] HE Y, CHEN Q, DAI J, et al. Single-cell RNA-Seq reveals a highly coordinated transcriptional program in mouse germ cells during primordial follicle formation [J]. *Aging Cell*, 2021, 20(7): e13424.
- [7] WANG J J, GE W, ZHAI Q Y, et al. Single-cell transcriptome landscape of ovarian cells during primordial follicle assembly in mice [J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(12): e3001025.
- [8] NIU W, SPRADLING A C. Two distinct pathways of pregranulosa cell differentiation support follicle formation in the mouse ovary [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(33): 20015-26.
- [9] WANG Z, LIU C Y, ZHAO Y, et al. FIGLA, LHX8 and SOHLH1 transcription factor networks regulate mouse oocyte growth and differentiation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(7): 3525-41.
- [10] SOYAL S M, AMLEH A, DEAN J. FIG α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation [J]. *Development*, 2000, 127(21): 4645-54.
- [11] RAJKOVIC A, PANGAS S A, BALLOW D, et al. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression [J]. *Science*, 2004, 305(5687): 1157-9.

- [12] ZHANG X, LIU R, SU Z, et al. Immunohistochemical study of expression of *Sohlh1* and *Sohlh2* in normal adult human tissues [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137431.
- [13] SHIN Y H, REN Y, SUZUKI H, et al. Transcription factors *SOHLH1* and *SOHLH2* coordinate oocyte differentiation without affecting meiosis I [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(6): 2106-17.
- [14] CHOI Y, YUAN D, RAJKOVIC A. Germ cell-specific transcriptional regulator *sohlh2* is essential for early mouse folliculogenesis and oocyte-specific gene expression [J]. *Biol Reprod*, 2008, 79(6): 1176-82.
- [15] D'IGNAZIO L, MICHEL M, BEYER M, et al. *Lhx8* ablation leads to massive autophagy of mouse oocytes associated with DNA damage [J]. *Biol Reprod*, 2018, 98(4): 532-42.
- [16] REN Y, SUZUKI H, JAGARLAMUDI K, et al. *Lhx8* regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis [J]. *BMC Biol*, 2015, 13: 39.
- [17] HUNTRISS J, GOSDEN R, HINKINS M, et al. Isolation, characterization and expression of the human factor in the germline alpha (*FIGLA*) gene in ovarian follicles and oocytes [J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(12): 1087-95.
- [18] JORDAN P, VEREBI C, PEROL S, et al. *NOBOX* gene variants in premature ovarian insufficiency: ethnicity-dependent insights [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2024, 41(1): 135-46.
- [19] BAYRAM Y, GULSUNER S, GURAN T, et al. Homozygous loss-of-function mutations in *SOHLH1* in patients with nonsyndromic hypergonadotropic hypogonadism [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(5): E808-14.
- [20] QIN Y, JIAO X, DALGLEISH R, et al. Novel variants in the *SOHLH2* gene are implicated in human premature ovarian failure [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(4): 1104-9.e6.
- [21] BOUILLY J, BEAU I, BARRAUD S, et al. Identification of multiple gene mutations accounts for a new genetic architecture of primary ovarian insufficiency [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(12): 4541-50.
- [22] UDA M, OTTOLENGHI C, CRISPONI L, et al. *Foxl2* disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development [J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(11): 1171-81.
- [23] SCHMIDT D, OVITT C E, ANLAG K, et al. The murine winged-helix transcription factor *Foxl2* is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance [J]. *Development*, 2004, 131(4): 933-42.
- [24] FU A, OBERHOLTZER S M, BAGHERI-FAM S, et al. Dynamic expression patterns of *Irx3* and *Irx5* during germline nest breakdown and primordial follicle formation promote follicle survival in mouse ovaries [J]. *PLoS Genet*, 2018, 14(8): e1007488.
- [25] FU A, KOTH M L, BROWN R M, et al. *IRX3* and *IRX5* collaborate during ovary development and follicle formation to establish responsive granulosa cells in the adult mousedagger [J]. *Biol Reprod*, 2020, 103(3): 620-9.
- [26] VORONINA E, LOVASCO L A, GYURIS A, et al. Ovarian granulosa cell survival and proliferation requires the gonad-selective TFIID subunit *TAF4b* [J]. *Dev Biol*, 2007, 303(2): 715-26.
- [27] FALENDER A E, SHIMADA M, LO Y K, et al. *TAF4b*, a TBP associated factor, is required for oocyte development and function [J]. *Dev Biol*, 2005, 288(2): 405-19.
- [28] PEPLING M E, SPRADLING A C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles [J]. *Dev Biol*, 2001, 234(2): 339-51.
- [29] JOHNSON J, ESPINOZA T, MCGAUGHEY R W, et al. Notch pathway genes are expressed in mammalian ovarian follicles [J]. *Mech Dev*, 2001, 109(2): 355-61.
- [30] GUO M, ZHANG H, BIAN F, et al. *P4* down-regulates *Jagged2* and *Notch1* expression during primordial folliculogenesis [J]. *Front Biosci*, 2012, 4(8): 2631-44.
- [31] FENG Y M, LIANG G J, PAN B, et al. Notch pathway regulates female germ cell meiosis progression and early oogenesis events in fetal mouse [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(5): 782-91.
- [32] XU J, GRIDLEY T. *Notch2* is required in somatic cells for breakdown of ovarian germ-cell nests and formation of primordial follicles [J]. *BMC Biol*, 2013, 11: 13.
- [33] MANOSALVA I, GONZALEZ A, KAGEYAMA R. *Hes1* in the somatic cells of the murine ovary is necessary for oocyte survival and maturation [J]. *Dev Biol*, 2013, 375(2): 140-51.
- [34] FENG L, WANG Y, CAI H, et al. *ADAM10*-Notch signaling governs the recruitment of ovarian pregranulosa cells and controls folliculogenesis in mice [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(11): 2202-12.
- [35] HUGHES C H K, SMITH O E, MEINSOHN M C, et al. Steroidogenic factor 1 (*SF-1*; *Nr5a1*) regulates the formation of the ovarian reserve [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(32): e2220849120.
- [36] KAWABATA M, IMAMURA T, MIYAZONO K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1998, 9(1): 49-61.
- [37] CHAKRABORTY P, ROY S K. Bone morphogenetic protein 2 promotes primordial follicle formation in the ovary [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12664.
- [38] NIU W, WANG Y, WANG Z, et al. *JNK* signaling regulates *E-cadherin* junctions in germline cysts and determines primordial follicle formation in mice [J]. *Development*, 2016, 143(10): 1778-87.
- [39] ZHAO L, DU X, HUANG K, et al. *Rac1* modulates the formation of primordial follicles by facilitating *STAT3*-directed *Jagged1*, *GDF9* and *BMP15* transcription in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23972.
- [40] ZHANG J, LIU W, SUN X, et al. Inhibition of *mTOR* signaling pathway delays follicle formation in mice [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(3): 585-95.
- [41] WANG C, ZHOU B, XIA G. Mechanisms controlling germline cyst breakdown and primordial follicle formation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(14): 2547-66.
- [42] HSUEH A J, KAWAMURA K, CHENG Y, et al. Intraovarian control of early folliculogenesis [J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(1): 1-24.
- [43] ZHENG W, NAGARAJU G, LIU Z, et al. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (*PI3Ks*) signaling in the mammalian ovary [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 356(1/2): 24-30.
- [44] RICHARDSON S J, SENIKAS V, NELSON J F. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987, 65(6): 1231-7.
- [45] ANDERSON R A, ROBINSON L L L, BROOKS J, et al. Neurotrophins and their receptors are expressed in the human fetal ovary

- [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(2): 890-7.
- [46] DISSEN G A, ROMERO C, HIRSHFIELD A N, et al. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(5): 2078-86.
- [47] PAREDES A, ROMERO C, DISSEN G A, et al. TrkB receptors are required for follicular growth and oocyte survival in the mammalian ovary [J]. *Dev Biol*, 2004, 267(2): 430-49.
- [48] STREITER S, FISCH B, SABBABH B, et al. The importance of neuronal growth factors in the ovary [J]. *Mol Hum Reprod*, 2016, 22(1): 3-17.
- [49] CHANG H M, WU H C, SUN Z G, et al. Neurotrophins and glial cell line-derived neurotrophic factor in the ovary: physiological and pathophysiological implications [J]. *Hum Reprod Update*, 2019, 25(2): 224-42.
- [50] NILSSON E, DOLE G, SKINNER M K. Neurotrophin NT3 promotes ovarian primordial to primary follicle transition [J]. *Reproduction*, 2009, 138(4): 697-707.
- [51] ESMAIELZADEH F, HOSSEINI S M, NASIRI Z, et al. Kit ligand and glial-derived neurotrophic factor as alternative supplements for activation and development of ovine preantral follicles *in vitro* [J]. *Mol Reprod Dev*, 2013, 80(1): 35-47.
- [52] YAMAMOTO K, NAKANO Y, IWATA N, et al. Stimulatory effects of vasopressin on progesterone production and BMP signaling by ovarian granulosa cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 667: 132-7.
- [53] DONG J, ALBERTINI D F, NISHIMORI K, et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis [J]. *Nature*, 1996, 383(6600): 531-5.
- [54] MARTINS F S, CELESTINO J J H, SARAIVA M V A, et al. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2008, 20(8): 916-24.
- [55] SKAZNIK-WIKIEL M E, SWINDLE D C, ALLSHOUSE A A, et al. High-fat diet causes subfertility and compromised ovarian function independent of obesity in mice [J]. *Biol Reprod*, 2016, 94(5): 108.
- [56] FAN Z, ZHANG X, SHANG Y, et al. Intestinal flora changes induced by a high-fat diet promote activation of primordial follicles through macrophage infiltration and inflammatory factor secretion in mouse ovaries [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4797.
- [57] MAGAMAGE M P S, ZENGYO M, MONIRUZZAMAN M, et al. Testosterone induces activation of porcine primordial follicles *in vitro* [J]. *Reprod Med Biol*, 2011, 10(1): 21-30.
- [58] LI X, DONG H, ZHENG Y, et al. AKAP12 inhibits esophageal squamous carcinoma cell proliferation, migration, and cell cycle via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Mol Cell Probes*, 2023, 72: 101939.
- [59] RAN L, MOU X, PENG Z, et al. ADORA2A promotes proliferation and inhibits apoptosis through PI3K/AKT pathway activation in colorectal carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 19477.
- [60] JIANG M, CHEN R, HU B, et al. FATP2 activates PI3K/Akt/mTOR pathway by inhibiting ATF3 and promotes the occurrence and development of bladder cancer [J]. *Cellular Signalling*, 2024, 117.
- [61] REDDY P, ADHIKARI D, ZHENG W, et al. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(15): 2813-24.
- [62] ABDUL-MANAN N, AGHAZADEH B, LIU G A, et al. Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein [J]. *Nature*, 1999, 399(6734): 379-83.
- [63] YAN H, ZHANG J, WEN J, et al. CDC42 controls the activation of primordial follicles by regulating PI3K signaling in mouse oocytes [J]. *BMC Biol*, 2018, 16(1): 73.
- [64] ZHANG J, YAN L, WANG Y, et al. *In vivo* and *in vitro* activation of dormant primordial follicles by EGF treatment in mouse and human [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(5): e182.
- [65] CHONG-KOPERA H, INOKI K, LI Y, et al. TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(13): 8313-6.
- [66] ADHIKARI D, ZHENG W, SHEN Y, et al. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(3): 397-410.
- [67] XU B, LI Z, LI S, et al. Pathogenic variants in TSC2 might cause premature ovarian insufficiency through activated mTOR induced hyperactivation of primordial follicles [J]. *Fertil Steril*, 2022, 118(6): 1139-49.
- [68] ZHAO Y, ZHANG Y, LI J, et al. MAPK3/1 participates in the activation of primordial follicles through mTORC1-KITL signaling [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1): 226-37.
- [69] LONG G Y, YANG J Y, XU J J, et al. SIRT1 knock-in mice preserve ovarian reserve resembling caloric restriction [J]. *Gene*, 2019, 686: 194-202.
- [70] ZHANG T, DU X, ZHAO L, et al. SIRT1 facilitates primordial follicle recruitment independent of deacetylase activity through directly modulating Akt1 and mTOR transcription [J]. *FASEB J*, 2019, 33(12): 14703-16.
- [71] ZHANG T, HE M, ZHAO L, et al. HDAC6 regulates primordial follicle activation through mTOR signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 559.
- [72] CHEN J, LIU W, LEE K F, et al. Overexpression of Lin28a induces a primary ovarian insufficiency phenotype via facilitation of primordial follicle activation in mice [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2022, 539: 111460.
- [73] SETTE C, BEVILACQUA A, BIANCHINI A, et al. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa [J]. *Development*, 1997, 124(11): 2267-74.
- [74] PRABHU S M, MEISTRICH M L, MCLAUGHLIN E A, et al. Expression of c-Kit receptor mRNA and protein in the developing, adult and irradiated rodent testis [J]. *Reproduction*, 2006, 131(3): 489-99.
- [75] CHEN N, LI Y, WANG W, et al. Vasoactive intestinal peptide can promote the development of neonatal rat primordial follicles during *in vitro* culture [J]. *Biol Reprod*, 2013, 88(1): 12.
- [76] SUTHERLAND J M, KEIGHTLEY R A, NIXON B, et al. Suppressor of cytokine signaling 4 (SOCS4): moderator of ovarian primordial follicle activation [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(3): 1188-98.
- [77] SUTHERLAND J M, FROST E R, FORD E A, et al. Janus kinase JAK1 maintains the ovarian reserve of primordial follicles in the mouse ovary [J]. *Mol Hum Reprod*, 2018, 24(11): 533-42.
- [78] WANG Z P, MU X Y, GUO M, et al. Transforming growth

- factor- β signaling participates in the maintenance of the primordial follicle pool in the mouse ovary [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(12): 8299-311.
- [79] DURLINGER A L L, KRAMER P, KARELS B, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(12): 5789-96.
- [80] DURLINGER A L, GRUIJTERS M J, KRAMER P, et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(11): 4891-9.
- [81] CASTRILLON D H, MIAO L, KOLLIPARA R, et al. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a [J]. *Science*, 2003, 301(5630): 215-8.
- [82] LAN Z J, XU X, COONEY A J. Differential oocyte-specific expression of Cre recombinase activity in GDF-9-iCre, Zp3cre, and Msx2Cre transgenic mice [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(5): 1469-74.
- [83] JOHN G B, GALLARDO T D, SHIRLEY L J, et al. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth [J]. *Dev Biol*, 2008, 321(1): 197-204.
- [84] ADHIKARI D, FLOHR G, GORRE N, et al. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles [J]. *Mol Hum Reprod*, 2009, 15(12): 765-70.
- [85] RAJAREDDY S, REDDY P, DU C, et al. p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(9): 2189-202.
- [86] LIU L, RAJAREDDY S, REDDY P, et al. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a [J]. *Development*, 2007, 134(1): 199-209.
- [87] BAKER T G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1963, 158: 417-33.
- [88] GOUGEON A, ECOCHARD R, THALABARD J C. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women [J]. *Biol Reprod*, 1994, 50(3): 653-63.
- [89] HE Y, PENG X, WU T, et al. Restricting the induction of NGF in ovarian stroma engenders selective follicular activation through the mTOR signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2817.
- [90] XIAO Y, PENG X, PENG Y, et al. Macrophage-derived extracellular vesicles regulate follicular activation and improve ovarian function in old mice by modulating local environment [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(10): e1071.
- [91] CHATZIDAKI E E, POWELL S, DEQUEKER B J H, et al. Ovulation suppression protects against chromosomal abnormalities in mouse eggs at advanced maternal age [J]. *Curr Biol*, 2021, 31(18): 4038-51, e7.
- [92] LI J, KAWAMURA K, CHENG Y, et al. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(22): 10280-4.
- [93] KAWAMURA K, CHENG Y, SUZUKI N, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(43): 17474-9.
- [94] SUZUKI N, YOSHIOKA N, TAKAE S, et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(3): 608-15.
- [95] ZHAI J, YAO G, DONG F, et al. *In vitro* activation of follicles and fresh tissue auto-transplantation in primary ovarian insufficiency patients [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(11): 4405-12.
- [96] SUN X, SU Y, HE Y, et al. New strategy for *in vitro* activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(5): 721-31.
- [97] ZHAI J, ZHANG J, ZHANG L, et al. Autotransplantation of the ovarian cortex after in-vitro activation for infertility treatment: a shortened procedure [J]. *Hum Reprod*, 2021, 36(8): 2134-47.
- [98] ZHANG X, HAN T, YAN L, et al. Resumption of ovarian function after ovarian biopsy/scratch in patients with premature ovarian insufficiency [J]. *Reprod Sci*, 2019, 26(2): 207-13.
- [99] CLIFT D, SCHUH M. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(9): 549-62.
- [100] JONES K T, LANE S I R. Molecular causes of aneuploidy in mammalian eggs [J]. *Development*, 2013, 140(18): 3719-30.
- [101] GREANEY J, WEI Z, HOMER H. Regulation of chromosome segregation in oocytes and the cellular basis for female meiotic errors [J]. *Hum Reprod Update*, 2018, 24(2): 135-61.
- [102] GERAEDTS J, MONTAG M, MAGLI M C, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(11): 3173-80.
- [103] BITTO A, ITO T K, PINEDA V V, et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice [J]. *eLife*, 2016, 5.
- [104] ADHIKARI D, RISAL S, LIU K, et al. Pharmacological inhibition of mTORC1 prevents over-activation of the primordial follicle pool in response to elevated PI3K signaling [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53810.
- [105] ZHANG X M, LI L, XU J J, et al. Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating mTOR activation and sirtuin expression [J]. *Gene*, 2013, 523(1): 82-7.
- [106] DOU X, SUN Y, LI J, et al. Short-term rapamycin treatment increases ovarian lifespan in young and middle-aged female mice [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(4): 825-36.
- [107] LIU W, ZHANG C, WANG L, et al. Successful reversal of ovarian hyperstimulation syndrome in a mouse model by rapamycin, an mTOR pathway inhibitor [J]. *Mol Hum Reprod*, 2019, 25(8): 445-57.
- [108] ZHOU L, XIE Y, LI S, et al. Rapamycin prevents cyclophosphamide-induced over-activation of primordial follicle pool through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway *in vivo* [J]. *J Ovarian Res*, 2017, 10(1): 56.
- [109] ISOLA J V V, ZANINI B M, HENSE J D, et al. Mild calorie restriction, but not 17 α -estradiol, extends ovarian reserve and fertility in female mice [J]. *Exp Gerontol*, 2022, 159: 111669.
- [110] LIU W J, ZHANG X M, WANG N, et al. Calorie restriction inhibits ovarian follicle development and follicle loss through activating SIRT1 signaling in mice [J]. *Eur J Med Res*, 2015, 20(1): 22.
- [111] GHOSH H S, MCBURNEY M, ROBBINS P D. SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin [J]. *PLoS One*,

- 2010, 5(2): e9199.
- [112] LI L, FU Y C, XU J J, et al. Caloric restriction promotes the reserve of follicle pool in adult female rats by inhibiting the activation of mammalian target of rapamycin signaling [J]. *Reprod Sci*, 2015, 22(1): 60-7.
- [113] XIANG Y, XU J, LI L, et al. Calorie restriction increases primordial follicle reserve in mature female chemotherapy-treated rats [J]. *Gene*, 2012, 493(1): 77-82.
- [114] QIN X, DU D, CHEN Q, et al. Metformin prevents murine ovarian aging [J]. *Aging*, 2019, 11(11): 3785-94.
- [115] AYHAN S, HANCERLIOGULLARI N, GUNAY G, et al. Does the addition of metformin to carboplatin treatment decrease ovarian reserve damage associated with carboplatin usage [J]? *J Ovarian Res*, 2023, 16(1): 184.
- [116] SONG C, PENG W, YIN S, et al. Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35165.
- [117] YANG C, LIU Q, CHEN Y, et al. Melatonin delays ovarian aging in mice by slowing down the exhaustion of ovarian reserve [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 534.
- [118] ZHU R, JI X, WU X, et al. Melatonin antagonizes ovarian aging via YTHDF2-MAPK-NF-kappaB pathway [J]. *Genes Dis*, 2022, 9(2): 494-509.
- [119] FU X, HE Y, XIE C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage [J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(4): 353-63.
- [120] TAKEHARA Y, YABUUCHI A, EZOE K, et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function [J]. *Lab Invest*, 2013, 93(2): 181-93.
- [121] ZHANG Y, XIA X, YAN J, et al. Mesenchymal stem cell-derived angiogenin promotes primordial follicle survival and angiogenesis in transplanted human ovarian tissue [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017, 15(1): 18.
- [122] LV X, GUAN C, LI Y, et al. Effects of single and multiple transplantations of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the recovery of ovarian function in the treatment of premature ovarian failure in mice [J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14(1): 119.
- [123] PAN BT, JOHNSTONE R M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor [J]. *Cell*, 1983, 33(3): 967-78.
- [124] ZHUANG L, XIA W, CHEN D, et al. Exosomal LncRNA-NEAT1 derived from MIF-treated mesenchymal stem cells protected against doxorubicin-induced cardiac senescence through sponging miR-221-3p [J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 157.
- [125] FAZAELI H, KALHOR N, NASERPOUR L, et al. A comparative study on the effect of exosomes secreted by mesenchymal stem cells derived from adipose and bone marrow tissues in the treatment of osteoarthritis-induced mouse model [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 9688138.
- [126] YANG W, ZHANG J, XU B, et al. HucMSC-derived exosomes mitigate the age-related retardation of fertility in female mice [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(4): 1200-13.
- [127] ZHANG H, FANG Y, GAO Y, et al. Brown adipose tissue-derived exosomes delay fertility decline in aging mice [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1180104.