

· 综 述 ·

哺乳动物卵巢中生殖干细胞的研究历史与进展

罗 阳^{1,2}, 林 戈^{1,2*}

(1. 中南大学 生殖与干细胞工程研究所, 中国湖南 长沙 410078; 2. 中信湘雅生殖与遗传专科医院, 中国湖南 长沙 410078)

摘 要: 对于出生后的哺乳动物卵巢中是否存在生殖干细胞以维持卵泡的更新一直争议不断, 现就该领域的研究历史及最新进展进行综述.

关键词: 卵巢; 生殖干细胞; 卵泡; 卵母细胞

中图分类号: Q954.43

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2012)01-0085-05

Germ Stem Cells in the Mammalian Ovary—History and Recent Progress

LUO Yang^{1,2}, LIN Ge^{1,2*}

(1. Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China;

2. Reproductive and Genetic Hospital of CITIC-Xiangya, Changsha 410078, Hunan, China)

Abstract: Whether the germ stem cells exist in mammalian postnatal ovary to support oogenesis throughout reproductive life is a vigorous debate. The purpose of this review is to summarize the research history, recent progress and unclear questions in this field.

Key words: ovary; germ stem cells; follicle; oocyte

(*Life Science Research*, 2012, 16(1): 085-089)

雄性哺乳动物中, 由于精原干细胞的存在, 精子的发生可以贯穿于其整个生命周期. 长期以来, 雌性个体出生后的卵巢中拥有固定的卵泡数目并且数量逐渐下降是学界的普遍共识, 并作为一个定论出现在教科书中. 但是近来, 随着出生后卵巢中存在卵泡更新和生殖干细胞的相关研究结果的不断发表, 这一认识正发生改变. 本文将就卵巢中是否存在生殖干细胞的研究历史、现状及其存在的问题作一综述.

1 生殖细胞发育的基本过程

哺乳动物的生殖细胞皆由原始生殖细胞(primitive germ cells, PGCs) 增殖分化而来. 小鼠的 PGCs 起源于尿囊基底部的原条末端, 在胎龄第 7.25 d(embryonic day 7.25, E7.25)时完成生殖系的谱系限定而出现一团数目为 50 个左右的 PGCs^[1].

这些细胞高表达碱性磷酸酶活性, 且在组织形态学上表现为边界清晰, 大小为 15~20 μm , 形态上呈卵圆形, 核质比较低, 同时细胞核形态清晰, 具有明显的颗粒染色体^[2,3]. 随着胚胎发育的继续进行, E8.5 时 PGCs 被周围胚胎组织包裹并进入早期的后肠组织, 因为此时的 PGCs 还不具备迁移能力, 所以这一过程可能是被动完成的; E9.5 时, PGCs 开始离开后肠组织, 经背肠系膜进行迁移, E10.5 时到达背部肠系膜, 但此时已有部分 PGCs 开始进入生殖嵴区域, 在 E11.5 时绝大部分 PGCs 已经进入生殖嵴区域; 在迁移过程中, PGCs 展现出很强的有丝分裂能力, E8.5 时细胞群体数目仅 100 个, E10.5 时即达到 1 000 个, E13.5 时则增加至 25 000 个^[4,5], 此时的生殖细胞数目达到最大值. 随后, PGCs 不再进行有丝分裂并开始进入减数分裂而成为初级卵母细胞^[6], 该过程持续至出生后大

收稿日期: 2011-11-16; 修回日期: 2011-12-13

基金项目: 中南大学前沿研究计划前瞻布局研究重大项目(201021200070)

作者简介: 罗阳(1987-), 男, 湖北松滋人, 硕士研究生, 主要从事生殖发育和干细胞方面的研究; * 通讯作者: 林戈(1974-), 男, 湖南长沙人, 中南大学生殖与干细胞工程研究所副研究员, 主要从事人类生殖和辅助生殖技术应用以及人类干细胞方面的研究, E-mail: linggf36@yahoo.com.cn.

约第 5 d, 使得卵巢中所有的生殖细胞都发育到第一次减数分裂前期的双线期并停滞^[7]. 当小鼠青春性成熟时, 停滞的卵母细胞恢复减数分裂再次进入发育阶段, 但只有很少的一部分能够发育成熟排卵, 其它绝大多数生殖细胞则走向闭锁凋亡^[8, 9].

人类一般在受精后第 3~4 周, 卵黄囊后壁近尿囊处出现大而圆的并能游走的 PGCs; 从受精后的第 4~5 周开始, PGCs 沿后肠以及背侧肠系膜向生殖腺嵴迁移^[10]. 在受精后第 5 周末或第 6 周初, PGCs 迁移到达生殖嵴, 此时之后的 PGCs 又称之为卵原细胞, 到第 20 周时其数目达到最高峰, 可高达 600 万个, 随后卵原细胞开始大量凋亡, 只有一小部分卵原细胞能够生长分化为卵母细胞, 在出生时卵原细胞已经全部消失, 仅剩有约 100 万个停滞在第一次减数分裂前期的双线期的卵母细胞; 因此, 出生后的哺乳动物卵巢内, 卵母细胞的数目不再增加, 且数目逐渐减少^[11, 12].

2 卵巢中生殖细胞恒定论的确定

卵巢中是否存在生殖干细胞, 近一个世纪以来, 人们一直争论不断. 在 19 世纪之前, 人们一般认为出生后卵巢中卵母细胞的数目是固定不变的, 且随年龄增加数目逐渐下降^[13]. 但是 1917 年, Pearl 等的研究发现在被阉割了的成年鸡中卵巢组织能够重新生成, 且随后产生的卵母细胞比未阉割的成年鸡还要多^[14]. 1923 年, Allen 等报道称有证据表明卵巢整个生育期中卵母细胞都在不断的生成, 成年小鼠在发情期有 400~500 个新的卵母细胞生成^[15], 且认为是生殖上皮的增殖产生卵母细胞^[16]. 因此, 卵巢在出生后存在生殖细胞重新生成这个观点一时被广泛接受.

直到 1950 年, Zuckerman 通过长达 20 年之久的持续研究积累了大量的实验数据之后发现: 在对大多数哺乳动物的卵泡数目的广泛研究表明整个生命周期中并没有卵母细胞的生成, 并且没有实验支持出生后的卵巢有卵子的重新生成. 所以可以得出结论, 哺乳动物出生后其卵泡数目是固定不变的, 这篇具有里程碑意义的论文于 1951 年发表^[17]. 1962 年, Rudkin 等在雌鼠妊娠期中途经腹膜注射入氚标记的胸腺嘧啶核苷, 通过雌性胚胎卵母细胞核的自显影, 表明幼年及成年卵巢中的卵母细胞都是来自胎儿时期的生殖细胞, 且在整个生命中数目都没有增加^[18]. 1967 年, Borum^[19] 在实验中对第 E10-19 小鼠和新生雌鼠卵巢的

研究发现, 卵原细胞在 E14 d 开始进入减数分裂, E15 时所有生殖细胞都已进入减数分裂, 在 E17 时已没有处于细线期或偶线期的生殖细胞, 到胎儿期结束时, 卵母细胞均停留于双线期; 而在出生后第 5 d 的小鼠卵巢中, 有 20% 的卵母细胞处于双线期早期, 80% 的卵母细胞处于双线期晚期, 即出生后小鼠卵巢中没有新的卵母细胞出现. 因此, 以 Zuckerman 的结论为主, 在较多学者的证据支持下, 哺乳动物出生后卵泡不再更新, 卵巢中不存在生殖干细胞的观点为当时大多数人所接受而成为定论.

3 对生殖细胞恒定论的挑战

2004 年, Johnson 等^[20]通过对小鼠幼年及成年卵巢中健康卵泡和闭锁丢失卵泡数目进行分析, 认为按照出生后小鼠卵巢中卵泡的闭锁速率, 卵泡理应很快消耗殆尽. 而实验事实却与之相反, 且与闭锁速度相比, 非闭锁卵泡数目下降较慢, 对位于卵巢上皮层的大卵圆形细胞进行免疫组化分析及增殖标记染色分析使他们认为出生后的卵巢中有生殖细胞的增殖和卵泡更新. 而在用白消安处理后的小鼠卵巢中, 出现了具有非退化卵母细胞的健康成熟卵泡, 并有显示排卵的黄体存在, 这进一步说明存在能补充卵泡的增殖性生殖细胞. 最后, 将野生型小鼠的卵巢组织移植到表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 的雌性转基因小鼠卵巢后, 发现移植的卵巢切片中产生了能表达 GFP 的卵母细胞. 因此, 通过这一系列实验, 他们认为出生后的卵巢中有生殖干细胞(germline stem cells, GSCs), 而且位于卵巢表面大的、呈卵圆形的生殖细胞有可能是 GSCs. 这篇文章在《Nature》上一经发表, 即在学术界引起了轩然大波, 使得科学家对出生后的哺乳动物是否存在生殖干细胞产生了激烈的争论. 此后, 一系列支持卵巢存在卵泡再生的证据相继发表.

2005 年, Johnson 等^[21]将骨髓移植至经环磷酰胺和白消安处理后丧失了生殖细胞的小鼠体内, 实验中发现接受了骨髓移植的小鼠卵巢中有卵泡生成, 而对照组小鼠卵巢中则没有或很少有卵泡生成. 此外, 将取自能表达 GFP 转基因雌性小鼠的外周血移植至经过相同处理的小鼠体内, 在卵巢中发现了表达 GFP 的卵母细胞. 因此, 与其先前的研究结论^[20]相同, 他们认为出生后的卵巢中存在卵母细胞和卵泡的更新. 但不同的是,

在此次研究中他们认为骨髓和外周血是 GSCs 的潜在来源^[21]. 2006 年 Kerr 等^[22]运用立体学计数方法,同时对减数分裂的卵母细胞进行生殖细胞核抗原免疫标记,对卵巢细胞进行增殖细胞核抗原免疫标记的免疫组化方法,对 1~200 d 小鼠卵巢中的健康卵泡数目进行量化和统计分析,认为虽然没有存在卵巢生殖干细胞的证据,但实验数据支持出生后的鼠及成年小鼠卵巢中是存在卵泡更新这个假说. 2007 年, Lee 等^[23]通过对细胞周期调节基因 Cables1 (cyclin-dependent kinase-5 and ABL enzyme substrate 1) 敲除小鼠模型的研究发现: Cables1 敲除雌性小鼠卵母细胞的闭锁发生率同野生型小鼠相比显著增加了,但是 Cables1 敲除雌性小鼠从 1.5 个月到 6 个月间,其包括原始卵泡在内的所有不成熟卵泡数目基本没有变动. 因此他们认为出生后的哺乳动物卵巢中是存在新的卵母细胞及卵泡生成的.

2008 年, Zhang 等^[24]以生殖组织中特异表达增强 GFP 的转基因小鼠为动物模型,运用免疫组织化学分析及反式聚合酶链式反应技术,通过检测小鼠 Vasa^[25, 26] 同系物 (mouse vasa homologue, MVH)、干细胞因子受体、阶段特异性胚胎抗原-1 和生长分化因子-9 等生殖细胞及干细胞标记物的表达,在成年小鼠卵巢中发现一不同于卵泡细胞的细胞聚合物,能共表达生殖与干细胞表面标记,因此,他们认为这些细胞聚合物是生殖细胞与生殖干细胞的混合物. 而 Bukovsky 等^[27]运用进入减数分裂的标记物联会复合物蛋白 3 (synaptonemal complex protein 3, SCP3), 经一系列实验后得出结论,认为包括高等脊椎动物在内的多种动物成年后一定时期内都存在新的卵子发生及卵泡更新.

2009 年, Tilly 等^[28]在研究中发现老年小鼠的卵巢中存在处于减数分裂前的生殖细胞,当将生殖特异性表达 GFP 的老年转基因小鼠的卵巢组织移植到野生型年轻小鼠后,发现这些处于休眠状态的生殖细胞能被激活产生新的卵母细胞. 所以,他们在文章中认为老年小鼠卵巢中具有一些能够产生新卵母细胞的减数分裂前生殖细胞.

对于人类, Bukovsky 等^[29]在实验中发现成年人类女性的卵巢上皮组织在体外培养时有卵泡重新生成的现象. Klun 等^[30]在取自患有卵巢功能早衰和绝经后妇女的卵巢上皮组织中,也发现有具有泡状结构的小圆形细胞,但此时的卵巢组织在自然状态下是应该没有卵母细胞或卵泡的. 而

且它们表达胚胎发育早期的一些特异性标记物,并在培养过程中能够产生同体外培养的人类卵母细胞一样的卵母细胞样细胞,有的还能形成透明带状结构. 因此,他们与 Bukovsky 等的研究结论一致^[29],认为卵泡中存在一类干细胞,可以作为生殖细胞更新的来源.

但是,尽管以上大量的实验数据支持哺乳动物出生后存在卵泡更新,但也没有出现确认女性生殖干细胞存在的直接证据. 与此同时,对于上述挑战卵泡恒定论观点的质疑也同样不断出现.

4 对生殖细胞恒定论的支持

2005 年, Byskov 等^[31]在其评论文章中指出: Johnson 等的实验并不能支持其小鼠出生后卵巢中有新的卵子发生的结论,不能作为成年哺乳动物卵巢中有卵泡新生的充分证据.

2006 年, Eggan 等^[32]针对 Johnson 等成年哺乳动物骨髓和外周血能导致新的卵母细胞形成的结论,将表达 GFP 的转基因小鼠与野生型正常小鼠配对形成嵌合体小鼠,进行嵌合的两只小鼠的外周血都具有高水平的嵌合性. 按照预期,在野生型小鼠卵巢内应有 GFP 标记的生殖细胞,在转基因小鼠内应有不表达 GFP 的卵母细胞. 然而,对嵌合体小鼠超排卵后获得的卵母细胞分析发现,来自转基因小鼠的卵母细胞都强烈表达 GFP,而来自野生型小鼠的卵母细胞没有表达 GFP. 接下来,将该种嵌合体小鼠模型中的野生型小鼠用环磷酸胺和白消安进行处理,同样,之后收集到的卵母细胞也没有表达 GFP. 而在骨髓移植实验中,移植的骨髓细胞不可能转变或显著改善成熟前绝经或是化疗导致的不育情况. 因此,他们认为成年哺乳动物的卵母细胞数目是固定的,也不能由循环的“生殖祖细胞”更新生成. Eggan 等的研究结论也得到了其他学者研究证据的支持^[33].

2008 年, Begum S 等^[34]通过小鼠卵巢的移植实验,没有发现支持小鼠卵巢中有卵母细胞再生的证据,因此他们与“一定数目的卵母细胞在出生前就已形成,并逐渐减少”的传统观念保持一致. 但他同时也认为这无法排除成年小鼠卵巢中存在生殖干细胞的可能性. 而 Liu 等^[35]声称通过对成年女性的卵巢中的生殖细胞进行增殖和减数分裂的标记基因表达检测分析,认为不存在生殖细胞的更新或卵母细胞的生成,也没有生殖干细胞的存在. 但由于女性卵巢中的生殖干细胞研究还不深

人,目前还没有公认的有效标记物,因此,对于该学者实验中以 SCP3 作为鉴定标记物还有待商榷。

5 最新研究进展及存在的问题

就在大家为卵巢中是否存在生殖干细胞,以及来源在哪争论不休时,实验研究中出现了重大进展。吴际领导的研究团队报道^[36],对出生后 5 d 和成年小鼠的卵巢,通过两步酶消化和免疫磁性分离法将小鼠卵巢中表达 MVH 的细胞分离出来,在掺入了 5-溴, 2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)的培养基中进行培养。由于出生后小鼠卵巢中生殖细胞是不再进行有丝分裂增殖的,故认为 MVH 和 BrdU 都呈现阳性的细胞有可能是雌性 GSCs。他们将这种呈现双阳性的细胞分离出来建系并能够体外长时间培养,经过多次传代培养后 MVH 和 BrdU 仍呈阳性,且经 BrdU 和 DAPI 免疫荧光分析显示它们正在经历有丝分裂。同时,他们还将事先感染了 GFP 病毒的雌性 GSCs 移植到经过环磷酰胺和白消安处理而导致不育的小鼠卵巢中,一段时间后发现了表达 GFP 卵母细胞的存在,而在没有移植的对照试验组小鼠卵巢中则没有,这表明移植的雌性 GSCs 产生了卵母细胞。接着,他们通过实验又证实了将这些雌性 GSCs 移植到不育的受体小鼠,与野生型雄鼠经自然交配后能够产生后代,并且如果移植转基因操作后的雌性 GSCs 则可以产生转基因后代。因此,他们宣称发现了卵巢中生殖干细胞的存在,这些细胞具有相似于精原干细胞的一般特征,且定位于卵巢表面上皮层。2011 年,该研究组又称原先 MVH 磁珠分选和纯化雌性 GSCs 的效率低下,而通过采用生殖性特异表达蛋白 *Fragilis* 进行磁珠分选能显著提高雌性 GSCs 纯化的效率^[37]。

在近几年的研究中,有越来越多的证据倾向于支持卵巢中存在生殖干细胞的观点,2009 年吴际等的研究成果更是一个关键的证据。如果这个观点一旦得到最终的确认,将会打破权威,从而改变人们现有观念,引发科研人员对一些现存公认的学术观点进行质疑性或回顾性研究,而对医学和生物学研究史带来重要影响。在实际应用方面,也将开辟生物医学的新领域。首先,在获取卵母细胞上,可以不必收集人类卵巢组织进行繁琐的连续培养,通过培养卵巢生殖干细胞即可相对简单的达到目的,因而使得未成熟卵母细胞体外

成熟技术更为便利,同时对于优良动物品种的开发研究、濒危动物的保护等方面也具有重要意义;其次,这将是干细胞研究领域的又一重大突破,并为成体干细胞家族增加又一成员,而开辟新的研究领域。另外,临床上基于出生后卵巢中卵泡不再更新观念的治疗方案将发生根本转变,卵巢癌症与卵泡耗尽有关假说^[38]也将迎来解决的曙光,健康女性不用再受绝经问题困扰,老年妇女同样有受孕的机会。而罹患癌症的患者可以再化疗之前储存生殖干细胞,以保存生殖能力。通过建立相应的生殖干细胞库,可以为缺少卵子来源的夫妇进行供卵,从而结合试管婴儿技术,满足其生育梦想。

但是由于卵巢生殖干细胞的研究还不够深入和全面,目前研究中用到的生化检测标记繁多,另外干细胞的组织形态标准不确定,因此在卵巢生殖干细胞的组织生化鉴定上还需要系统深入的研究。另外,目前进展还需要多个物种进行验证,而在关键人类卵巢的研究领域还缺乏新的重要进展,虽然同为哺乳动物,但人与小鼠毕竟还是有很大不同。且虽然成功地分离和鉴定女性生殖干细胞很重要,但这也不能说明这些细胞就一定在决定出生后的卵泡数目或卵巢衰竭的时间上起重要作用^[39]。即使最终卵巢中发现了生殖干细胞,其生物学特性及在对卵巢发育和功能的作用亦需要做更多研究,才能发挥其临床价值。

Notarianni 在其最新发表的文章中认为,这些支持哺乳动物出生后存在新的卵子发生的证据并不是很充分,并对这些支持生殖干细胞存在观念的文献中的证据进行了重新解释,使之仍然能符合长期以来的生殖细胞恒定论^[40]。

总之,这个领域还有许多研究需要做,其在人类的实际应用更要克服重重困难,或许对于精原干细胞的深入研究有助于这些问题的解决。

6 结语

在对哺乳动物卵巢出生后是否存在生殖细胞更新这个问题的大量研究中,有支持存在的实验证据,也有反对的。也或许这两方面的研究不存在根本的对立,而仅是卵巢较为复杂的生物学特征所呈现的部分真相。而目前卵巢中生殖干细胞研究的重大进展则更激动人心,对于阐明卵巢生物学,更深入理解生殖生物学都将具有重要意义。虽然由于这方面的研究还不够深入,学术界还没

有确切的结论, 但相信由于该研究所具有的重大意义, 新的进展必将会不断出现.

参考文献(References):

- [1] MACGREGOR G R, ZAMBROWICZ B P, SORIANO P, *et al.* Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells[J]. *Development*, 1995, 121(5): 1487-1496.
- [2] MOTTA P M, MAKABE S, NOTTOLA S A, *et al.* The ultrastructure of human reproduction I. The natural history of the female germ cell: Origin, migration and differentiation inside the developing ovary[J]. *Human Reproduction Update*, 1997, 3(3): 281-295.
- [3] PEREDA J, ZOM T, SOTO-SUAZO M, *et al.* Migration of human and mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: An ultrastructural and cytochemical study[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2006, 69(6): 386-395.
- [4] TAM P P, SNOW M H. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos[J]. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 1981, 64: 133-147.
- [5] OZDZENSKI W. Observations on the origin of primordial germ cells in the mouse[J]. *Zoologica Poloniae*, 1967, 17: 367-379.
- [6] PEPLING M E, SPRADLING A C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles[J]. *Developmental Biology*, 2001, 234(2): 339-351.
- [7] MCLAREN A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells[J]. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 1984, 38: 7-23.
- [8] PEREZ G I, ROBLES R, KNUDSON C M, *et al.* Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency[J]. *Nature Genetics*, 1999, 21(2): 200-203.
- [9] TILLY J L. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2(11): 838-848.
- [10] MCKAY K D, HERTIG A T, ADAMS E C, *et al.* Histochemical observations on the germ cells of human embryos[J]. *The Anatomical Record*, 1953, 117(2): 201-219.
- [11] OKTEM O, URMAN B. Understanding follicle growth *in vivo*[J]. *Human Reproduction*, 2010, 25(12): 2944-2954.
- [12] FADDY M J. Follicle dynamics during ovarian ageing[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2000, 163(1-2): 43-48.
- [13] TILLY J L, NIKURA Y, RUEDA B R. The current status of evidence for and against postnatal oogenesis in mammals: a case of ovarian optimism versus pessimism?[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 80(1): 2-12.
- [14] PEARL R. Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl[J]. *Genetics*, 1917, 2(5): 417-432.
- [15] ALLEN E. Ovogenesis during sexual maturity[J]. *American Journal of Anatomy*, 1923, 31(5): 439-481.
- [16] EVANS H M, SWEZY O. Ovogenesis and the normal follicular cycle in adult mammalia[J]. *California and Western Medicine*, 1932, 36(1): 60.
- [17] ZUCKERMAN S. The number of oocytes in the mature ovary[J]. *Recent Progress in Hormone Research*, 1951, 6: 63-109.
- [18] RUDKIN G T, GRIECH H A. On the persistence of oocyte nuclei from fetus to maturity in the laboratory mouse[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1962, 12(1): 169-175.
- [19] BORUM K. Oogenesis in the mouse: A study of the origin of the mature ova[J]. *Experimental Cell Research*, 1967, 45(1): 39-47.
- [20] JOHNSON J, CANNING J, KANEKO T, *et al.* Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary[J]. *Nature*, 2004, 428(6979): 145-150.
- [21] JOHNSON J, BAGLEY J, SKAZNIK-WIKIEL M, *et al.* Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood [J]. *Cell*, 2005, 122(2): 303-315.
- [22] KER J B, DUEKETT R, MYERS M, *et al.* Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply [J]. *Reproduction*, 2006, 132(1): 95-109.
- [23] LEE H J, SAKAMOTO H, LUO H, *et al.* Loss of CABLES1, a cyclin-dependent kinase-interacting protein that inhibits cell cycle progression, results in germline expansion at the expense of oocyte quality in adult female mice[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(21): 2678-2684.
- [24] ZHANG D, FOUAD H, ZOMA W D, *et al.* Expression of stem and germ cell markers within nonfollicle structures in adult mouse ovary[J]. *Animal Reproduction Science*, 2008, 15(2): 139-146.
- [25] FUJIWARA Y, KOMIYA T, KAWABATA H, *et al.* Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of Drosophila vasa and its specific expression in germ cell lineage[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91(25): 12258-12262.
- [26] NOCE T, OKAMOTO-ITO S, TSUNEKAWA N. Vasa homolog genes in mammalian germ cell development[J]. *Cell Structure and Function*, 2001, 26(3): 131-136.
- [27] BUKOVSKY A, CAUDLE M R, GUPTA S K, *et al.* Mammalian neo-oogenesis and expression of meiosis-specific protein SCP3 in adult human and monkey ovaries [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(5): 683-686.
- [28] NIKURA Y, NIKURA T, TILLY J L. Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment[J]. *Ageing*, 2009, 1(12): 971-978.
- [29] BUKOVSKY A, SVETLIKOVA M, CAUDLE M R. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2005, 3(17): 1-13.
- [30] VIRANT-KLUN I, ZECH N, ROZMAN P, *et al.* Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes[J]. *Differentiation*, 2008, 76(8): 843-856.
- [31] BYSKOY A G, FADDY M J, LEMMEN J G, *et al.* Eggs forever?[J]. *Differentiation*, 2005, 73(9-10): 438-446.
- [32] EGGAN K, JURGA S, GOSDEN R, *et al.* Ovulated oocytes in adult mice derive from noncirculating germ cells[J]. *Nature*, 2006, 441(7097): 1109-1114.
- [33] VEITIA R A, GLUCKMAN E, FELLOUS M, *et al.* Recovery of fertility after chemotherapy, irradiation and bone marrow allograft: further evidence against massive oocyte regeneration by bone marrow-derived germline stem cells[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(5): 1334-1335.
- [34] BEGUM S, PAPAIOANNOU V E, GOSDEN R G. The oocyte population is not renewed in transplanted or irradiated adult ovaries[J]. *Human Reproduction*, 2008, 23(10): 2326-2330.
- [35] LIU Y, WU C, LYU Q, *et al.* Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary[J]. *Developmental Biology*, 2007, 306(1): 112-120.
- [36] ZOU K, YUAN Z, YANG Z, *et al.* Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries[J]. *Nature Cell Biology*, 2009, 11(5): 631-636.
- [37] ZOU K, HOU L, SUN K, *et al.* Improved efficiency of female germline stem cell purification using Fragilis-based magnetic bead sorting [J]. *Stem Cells and Development*, 2011, 20(12): 2197-2204.
- [38] SMITH E R, XU Xiang-xi. Ovarian ageing, follicle depletion, and cancer: a hypothesis for the aetiology of epithelial ovarian cancer involving follicle depletion[J]. *The Lancet Oncology*, 2008, 9(11): 1108-1111.
- [39] TILLY J L, TELFER E E. Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock?[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2009, 15(7): 393-398.
- [40] NOTARIANNI E. Reinterpretation of evidence advanced for neo-oogenesis in mammals, in terms of a finite oocyte reserve[J]. *Journal of Ovarian Research*, 2011, 4(1): 1-20.