

雌性哺乳动物生殖干细胞：在争议中前进*

陈忠良 杨世华**

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

摘要 100 多年以来, 雌性哺乳动物出生后是否存在生殖干细胞的争议尚无定论。2004 年, 研究人员从出生后的小鼠卵巢中发现并分离到雌性生殖干细胞(female germline stem cells, FGSCs), 挑战了存在近半个世纪的理论: 哺乳动物出生后不会对卵母细胞库进行更新。随后很多研究不仅指出哺乳动物出生后卵巢中新生成的卵母细胞源自 FGSCs, 而且发现如果将 FGSCs 移植回受体卵巢, 它们能够产生功能性的卵母细胞并由此得到健康的后代。可是, 有的研究小组重复实验或者精心设计实验, 却未得到相同的结果, 甚至得出相反的结果。最近, 有研究者从育龄女性卵巢中分离到了在体内外都能够分化出功能性卵母细胞的 FGSCs, 不过这些卵母细胞的受精能力还有待证实。本文回顾了哺乳动物 FGSCs 的研究历程, 并对这一存在已久的争论以及 FGSCs 研究方向和将来的运用前景展开了评述。

关键词 雌性生殖干细胞, 卵巢, 骨髓, 哺乳动物

学科分类号 Q291, Q492

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00017

纵观雌性哺乳动物生殖细胞发育研究史, 其中生殖细胞的产生与数量备受争议。1921 年, Pearl 和 Schoppe^[1]提出新生雌性哺乳动物卵巢内原始卵泡数量不会再增加。这一观点随即在 1923 年被否定。Allen 等^[2]指出女性在整个育龄中能够产生新的卵母细胞, 且周期性增殖的性腺上皮可能是卵母细胞的来源。随后, 许多研究的共同观点是: 大多数哺乳动物在出生后的整个生命过程中并不会产生新的卵母细胞^[3-6]。然而, 50 多年后, 雌性哺乳动物出生后生殖细胞数量是固定的这一观点再一次受到了挑战。2004 年, Johnson 等^[7]从出生后的小鼠卵巢中找到了能够自我更新且有能力产生成熟卵母细胞的雌性生殖干细胞(female germline stem cells, FGSCs), 经体外受精和胚胎移植产生了正常的有生育能力的后代^[8]。另外, 研究人员还发现了源自骨髓(bone marrow, BM)和外周血(peripheral blood)的 FGSCs^[9]。2012 年 White 等^[10]首次从育龄女性的卵巢中分离到了 FGSCs, 这些细胞也能在体内外分化出成熟的卵母细胞。这次发现无疑是对人类生殖生理认识的又一次巨大突破! 然而, 虽然这些研究找到了出生后的雌性哺乳动物体内存在 FGSCs 并且其能够对卵泡库进行更新的证据, 但这些结果

也遭到了不同程度的质疑。

1 生殖细胞特异表达蛋白 VASA

果蝇卵巢为研究生殖细胞发育提供了很好的模型。果蝇 Vasa 基因在生殖细胞发育过程中扮演着重要角色。Vasa 基因是编码含有 DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)盒的 RNA 解旋酶家族的成员, 这种蛋白具有 ATP 依赖性的 RNA 解旋酶活性^[11]。果蝇纯合 Vasa 等位基因突变使得其卵母细胞发育产生严重缺陷, 导致不育^[12]。Vasa 等位基因部分功能缺失的果蝇可产生卵母细胞, 但由此形成的胚胎却不能够产生生殖细胞^[13]。

Vasa 基因在非脊椎动物和脊椎动物中都是保守的^[14-16]。MVH 蛋白(mouse vasa homologue protein)^[16]

* 科技部重大科学研究计划重大科学问题导向(2012CBA01300), 教育部“新世纪国家优秀人才”支持计划(NCET-12-1078), 国家自然科学基金(31071279, 30871232)和云南省科技创新人才计划项目(2011CI009)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 013708768761, E-mail: yshhm@163.com

收稿日期: 2013-03-04, 接受日期: 2013-04-03

是果蝇 VASA 蛋白在小鼠体内的同源物, 发现其专一性地存在于发育的生殖细胞中. 人类 Vasa 基因也仅在卵巢和睾丸中表达^[17]. 因此可以看出 VASA 蛋白是生殖细胞的标志分子.

2 小鼠 FGSCs 的研究

2004 年, Johnson 等^[7]首次在出生后的小鼠卵巢中发现了生殖干细胞. 作者首先用白消安杀伤新生小鼠卵巢内的生殖细胞, 一段时间后这些小鼠卵巢内每天更新了大约 77 个原始卵泡. 随后研究中, 将野生型小鼠部分卵巢嫁接到表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的转基因小鼠卵巢中. 3~4 周后, 在野生型小鼠卵巢内发现了和受体小鼠卵巢中相似的卵泡和 GFP 阳性的卵母细胞, 但这些卵母细胞外围的卵丘细胞是 GFP 阴性的, 这表明 GFP 小鼠的生殖细胞已经浸润到嫁接的野生型小鼠卵巢中并开始了卵泡发生. 这一研究结果挑战了存在了 50 多年的生殖生物学观点: 哺乳动物出生后卵泡数量不会增加, 且以一定的速度衰减直至衰竭. 同时也引发了激烈的争论^[18-24]. 例如, Notarianni^[25]认为 Johnson 等^[7]对于 5- 溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)插入生殖细胞染色体而证明其具有增殖潜能的解释不合理. BrdU 也可能插入到大量复制的线粒体 DNA 或是减数分裂后期卵母细胞的 DNA 中.

Zou 等^[8]利用生物信息学工具 TMPRED 分析了 MVH 的氨基酸序列并预测到了 2 个跨膜区域. 随后采用与 Johnson 等^[7]相同的方法, 从新生和成年小鼠的卵巢中成功地分离到 FGSCs. 这些 FGSCs 在体外长期培养后仍保持着相同的形态特征并具有正常的核型和端粒酶活性. 将这些细胞用携带 GFP 基因的逆转录病毒载体感染后, 移植到事先用化疗药物处理过的不孕症雌鼠卵巢内. 2 个月后, 受体雌鼠的卵巢中出现了各种发育时期的卵母细胞, 包括 GFP 阳性的卵母细胞. 受体雌鼠与正常的野生型雄鼠交配后生下了正常的能够生育的 GFP 杂合子转基因后代. 上述研究结果为出生后的哺乳动物中存在雌性生殖干细胞提供了更为可靠的证据. 然而, Abban 等^[26]对 MVH 进行了相同的软件分析, 确实发现 MVH 存在着跨膜结构域, 但是这些跨膜结构域与 MVH 中两个特定的功能基序(如参与 RNA 解旋酶活性)发生了重叠. 因此, 作者认为这些具有催化性和结合性的基序能够同时作为跨膜区是让人费解的. Zhang 等^[27]设计了一种“彩虹小鼠

(Rosa26rb^{w/+}; Ddx4-Cre, rbw 代表彩虹)”来跟踪 Ddx4 (DEAD box polypeptide 4, 通常也被称为 mouse vasa homolog or MVH)阳性细胞在体内外的增殖和分化情况. 在这种小鼠中, 内源性的 Ddx4 启动子驱动 Cre 重组酶在生殖细胞中表达, 并在彩虹表达盒(依次编码 4 种不同的荧光蛋白)处诱导重组, 重组导致了 Ddx4 阳性细胞中的红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)、橙色荧光蛋白(orange fluorescent protein, OFP)或是蓝绿色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)随机表达, 而增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)在小鼠体细胞中始终表达. 这样, 通过改变荧光颜色就能够将表达 Ddx4 的生殖细胞和不能表达 Ddx4 的体细胞区分开. 研究发现来自出生后小鼠卵巢的 Ddx4 阳性细胞并没有进入有丝分裂. 卵泡重新生成实验中, 作者通过腹腔注射白消安和环磷酸胺使野生型雌鼠不育, 2 周后通过多点注射的方式将 12.5 天的彩虹胎鼠中能够表达 EGFP 的卵巢细胞注射到野生型不育小鼠的卵巢中. 4 周后在野生型小鼠的卵巢中发现了由 EGFP 阳性的卵母细胞和 EGFP 阳性的颗粒细胞组成的卵泡, 却没有找到嵌合型卵泡. 当长期培养彩虹小鼠卵巢细胞时, 也形成了一些 EGFP 阳性细胞克隆. 虽然这些细胞与卵母细胞相似, 但它们并不表达 Ddx4. 至此, 作者认为出生后的雌性哺乳动物体内不存在卵泡更新, 也就没有 FGSCs^[27]. 然而, Woods 等^[28]几乎对 Zhang 等^[27]的每一部分实验设计或是研究结果提出了质疑, 主要集中在以下几个方面:

a. 实验导致转基因小鼠中任何能够激活 Ddx4 启动子的细胞发生了永久性的遗传改变, 结果这些细胞将能够和生殖细胞一样表达 Ddx4 基因, 从而表现出相同的荧光蛋白表达模式;

b. 作者没有尝试用已经建立起来的分离方法^[7-8, 10]从转基因小鼠卵巢中分选出雌性生殖干细胞, 而仅仅因为 Ddx4 是一个被认为只存在于细胞质中而并不会在细胞表面表达的蛋白;

c. 没有分离出 FGSCs 或是指出 Ddx4 在发生重组细胞中的具体位置, 而卵母细胞和 FGSCs 都表达 Ddx4, 且两种细胞都会以永久性的方式发生遗传重组, 表现出相同的荧光蛋白表达模式;

d. 对于出生后重组小鼠卵巢内 Ddx4 阳性细胞不具有有丝分裂活性这一研究结果, 作者认为 Zhang 等分离到的这些细胞中根本不可能含有 FGSCs, 因为这些细胞的直径(所有细胞都大于

10 μm , 甚至更大)比正常的 FGSCs 的直径(一般是 5~6 μm , 不会超过 8 μm)要大, 它们很有可能是没有成熟的卵母细胞。

3 卵巢外来源的 FGSCs 研究

研究表明: 在 35~40 岁时, 人体内的免疫系统会发生严重的功能衰退^[29], 与卵巢中卵泡更新停止的时间一致^[30]。这表明年龄相关的免疫系统改变可能与体内卵子发生和卵泡更新的终止有关^[31-32]。Johnson 等^[9]首先发现骨髓(bone marrow, BM)细胞中存在着生殖细胞标记物。通过尾静脉将 BM 注射到经过化疗药物处理的不孕小鼠和基因突变缺陷型小鼠(不能产生卵母细胞)体内, 结果发现这些小鼠在 24 h 和 36 h 之后恢复了产生卵母细胞的能力。用外周血(peripheral blood)的移植实验也得到了相同的结果。上述研究结果表明, BM 和外周血作为一种潜在的生殖细胞资源能够维持成年小鼠卵母细胞的产生(图 1d)。这一研究成果被后续实验所证实^[33], 同时也受到了强烈的质疑^[34]。最直接有力的质疑可能是来自 Eggan 等^[35]的研究结果。为了研究清楚血液循环系统中的细胞是否会转变为成熟的卵母细胞, 该研究小组利用外科手术将野生型小鼠和能表达 GFP 的小鼠连接构成连体小鼠(parabiotic

mouse), 即连体小鼠共用一个循环系统。这对连体小鼠在 4~8 周龄时被连接在一起, 并且在连体持续 6~8 个月后进行排卵处理, 结果发现野生型小鼠中没有 GFP 阳性的卵母细胞, GFP 小鼠中也没有 GFP 阴性的卵母细胞。另一实验中, 预先用化疗药物处理连体小鼠中的野生型小鼠, 同样发现没有 GFP 阳性细胞交叉进入野生型小鼠中发育成为成熟卵母细胞。最后作者将 GFP 转基因小鼠的骨髓移植给预先用化疗药物或者低剂量全身辐射处理过的野生型小鼠, 结果在这些野生型小鼠体内发现了 GFP 阳性血液细胞, 但未见 GFP 阳性卵母细胞。所以, Eggan 等认为骨髓或是外周血中不可能存在雌性生殖干细胞。但对于上述存在相反结论的两篇研究报道有如下几方面的质疑或解释:

a. 即使骨髓和外周血中存在雌性生殖干细胞, 移植这些生殖细胞可能也不足以发生卵泡更新, 因为雌性受体的卵巢中可能缺乏原始颗粒细胞^[36]; 成年小鼠卵巢在经过环磷酸胺处理后卵泡确实会受到损伤, 但是在 24 h 之内就能够产生大量的、新的卵母细胞与正常情况下小鼠卵巢中卵子发生至少需要一个星期相违背^[37]。

b. 如果骨髓中含有 FGSCs, 20 多年来也进行了大量的利用骨髓移植进行癌症治疗的临床实验,

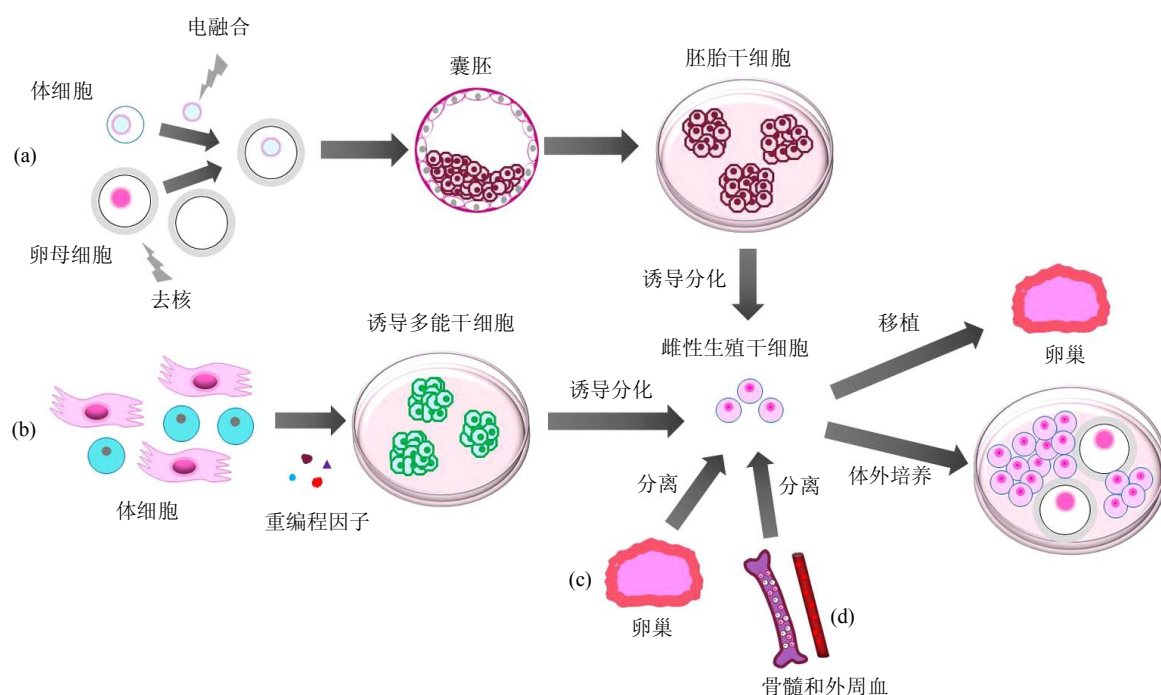


Fig. 1 Several possible ways to generate female germline stem cells in mammals

图 1 哺乳动物中产生雌性生殖干细胞的几条可能的途径

(a) 来源于体细胞核移植. (b) 来源于诱导多能干细胞. (c) 来源于卵巢. (d) 来源于骨髓或是外周血.

为什么没有见到恢复卵巢功能的报道呢^[7]? 另外, 一些研究结果显示, 移植的骨髓细胞不能为事先经过化疗药物处理过的受体雌鼠提供新的卵母细胞, 却能够在一定程度上改善卵巢的生理功能, 并由此可以提高受体小鼠的生育能力^[33, 37].

c. 在正常月经周期过程中, 为了在距离很远的卵巢中形成初级卵泡, 来自成年女性卵巢表面上皮的生殖细胞能够进入血管, 因此它们有可能污染了外周血和骨髓^[36].

d. Reizel 等^[20]重建细胞系发育树时发现, 在年轻和老年小鼠中卵母细胞形成的细胞簇与造血和间质干细胞分离, 且在胚胎时期就存在明显差别, 表明这些细胞属于不同的细胞系. 所以, 对出生后哺乳动物中的卵母细胞更新有促进作用的生殖干细胞是原始生殖细胞的后代, 而不可能源自骨髓细胞.

4 女性 FGSCs 研究

100 多年来, 有关人类出生后雌性生殖细胞是否能够更新的讨论就一直不断. 早在 20 世纪初, Allen 等^[2]和 Evans 等^[38]就指出: 在正常月经周期时, 生殖上皮细胞周期性地增加导致了成年卵巢皮质中的年轻卵母细胞数量增加. 1995 年, Bukovsky 等^[30-31]发现成年女性的卵巢表面上皮 (ovarian surface epithelium, OSE) 可能是生殖细胞的一个来源. 随后又指出成年女性卵巢中的初级卵泡池不是静止的, 而是一个既能进行分化又能复原的动态池. Bukovsky 等还发现, 在卵巢的皮质中, 卵母细胞与原始颗粒细胞的组装能够产生新的初级卵泡, 且再次指出原始颗粒细胞和生殖细胞依次从卵巢表面上皮细胞分化而来^[21, 39]. 然而, Notarianni^[25]认为, 上述研究^[21, 30-31, 39]中由体外培养卵巢表面上皮衍生物获得“卵母细胞样的细胞”的证据不足, 如大而圆的、细胞外也许包裹着一层类似透明带结构的细胞就被认为是卵母细胞难以让人接受, 因为所谓的透明带可能是细胞出现肿胀或细胞质膜发生分解的凋亡或癌变的细胞.

然而, 到了 2012 年, White 等^[10]从育龄女性卵巢中发现并分离到了表达 DDX4 的人类雌性生殖干细胞 (human female germline stem cells, hFGSCs). 将这些 hFGSCs 注射到严重联合免疫缺陷小鼠 (NOD-SCID) 体内没有形成畸胎瘤. 随后作者将 GFP 标记的 hFGSCs 注射到人类卵巢外皮组织块内, 再将这些组织块异体嫁接到 NOD-SCID 雌性

小鼠体内, 7~14 天后收集嫁接卵巢时发现部分卵泡中存在未成熟的 GFP 阳性卵母细胞, 对照组则没有^[10, 40]. 尽管异体嫁接的人类卵巢组织不能与正常生理状态下的卵巢组织等同, 但在这种情况下 hFGSCs 依然自发地进行了减数分裂并产生了功能性的卵母细胞, 这有力证明了 hFGSCs 存在的真实性. 然而, Oatley 等^[41]对 White 等^[10]的研究结果提出了质疑:

a. 有关 hFGSCs 存在的最重要证据是其产生正常卵母细胞的能力. White 等^[10]对形成的卵母细胞进行的相关测试也仅限于卵母细胞所表达的特异标记物、细胞形态和 DNA 含量的改变. 他们并没有提供针对这些细胞在遗传、受精能力等方面相关测试的证据^[41].

b. 卵母细胞在排卵前已经完成第一次减数分裂且被阻滞在第二次减数分裂中期^[42]. 在雌性的生殖道内等待受精的卵母细胞不是单倍体, 即使受精刺激卵母细胞完成第二次减数分裂同时形成单倍体, 也是精卵单倍体形成的二倍体合子. 卵母细胞在体内从来没有出现单倍体的状态. 所以, White 等^[10]在研究中获得了一定数量的单倍体卵母细胞是一个难以回答的问题^[41].

针对第二点, White 等^[28]认为以前的研究结果^[43-44]表明, 雌性哺乳动物体内的少量生殖细胞能够在没有精子存在的情况下自发地通过减数分裂形成单倍体的卵母细胞, 但同时也承认体外纯粹培养 hFGSCs 后产生单倍体的卵母细胞并不是其正常的能力.

5 展 望

在雄性动物方面, 目前已获得精原干细胞, 且能够在成年动物体内产生成熟精子, 这不仅有助于动物繁衍后代, 也为基础研究向工程化发展提供了可能. 但是雌性动物却不然. 成年雌性动物体内存在着大量卵泡, 在生殖周期中被募集、发育, 且仅有为数不多的卵子能够成熟和排卵, 目前对这一生理机理的了解也并不透彻, 而卵母细胞来源或是卵泡发生问题则更是扑朔迷离. 因此, 卵母细胞来源就成为研究胚胎生物学、发育生物学及胚胎工程的主要限制因素. 目前通常采用“杀鸡取卵”方法获取有限数量的卵子用于研究和生产, 这存在许多不科学之处, 也面临诸多伦理问题. 据此, 探求雌性动物生殖干细胞就成为缓解这一问题的关键. 这也可能为弄清卵泡周期发生及优势卵泡筛选与排卵机

制提供可能, 也有希望打破胚胎工程研究中卵子来源问题的壁垒, 加速生殖生物学研究和胚胎产业化发展。

随着社会发展越来越复杂, 人类发生不育及相关疾病的比例也越来越高, 人们对辅助生殖技术的依赖也越来越大。人类及其他哺乳动物在卵泡库衰竭过程中会逐渐表现出许多更年期相关的疾病。尽管胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)在治疗不育方面有着广阔的应用前景, 但也存在一些问题, 如致瘤性。源自 ESCs 的卵母细胞样细胞在减数分裂上也存在缺陷^[45-46](图 1a)。诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)理论上也能在体外诱导分化形成病人特异性的卵母细胞用于体外受精(图 1b), 且已经在小鼠上获得成功^[47], 但是否能真正用到临床上仍然不确定^[48]。然而, 来自成年女性卵巢的 FGSCs 则极有可能避免上述问题而用于临床治疗当中^[49], 应用前景广阔(图 1c)。另外, 如果能够便捷地将骨髓中可能存在的功能性 FGSCs 加以分离, 对于改善目前相关疾病的治疗状况、提高人们的生活质量将大有帮助。

目前, 对 FGSCs 了解的还不多, 在实现临床运用之前, 许多技术上和概念上的问题需要解决。例如, 改善纯化和培养 FGSCs 的方法, 评估这些细胞在体外产生卵母细胞的潜能, 也需要弄清 FGSCs 产生功能性卵母细胞的关键性信号通路, 以及提高分离 FGSCs 并使其转化为卵母细胞的效率。

另外, 出生后的哺乳动物卵巢中卵泡不会更新与卵巢中存在 FGSCs 也许不矛盾, FGSCs 的生殖潜能或许只是体外长期培养的结果, 而它们形成卵子的能力在正常条件下可能被阻滞了^[50]。如果真是这样, 那解除体内 FGSCs 的阻止枷锁、合理释放 FGSCs 的功能以及 FGSCs 卵巢原位的基础研究就显得更为重要和必然。

参 考 文 献

- [1] Pearl R, Schoppe W E. Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl. *J Exp Zool*, 1921, **34**(1): 101-118
- [2] Allen E, Creadick R N. Ovogenesis during sexual maturity. The first stage, mitosis in the germinal epithelium, as shown by the colchicine technique. *The Anatomical Record*, 1937, **69**(2): 191-195
- [3] Rudkin G T, Griech H A. On the persistence of oocyte nuclei from fetus to maturity in the laboratory mouse. *J Cell Biol*, 1962, **12**(1): 169-175
- [4] Borum K. Oogenesis in the mouse. A study of the origin of the mature ova. *Exp Cell Res*, 1967, **45**(1): 39-47
- [5] Peters H, Crone M. DNA synthesis in oocytes of mammals. *Arch Anat Microsc Morphol Exp*, 1967, **56**(3): 160-170
- [6] 季维智, 杨世华, 司 维. 猕猴繁殖生物学. 北京: 科学出版社, 2013: 31-35
- [7] Ji W Z, Yang S H, Si W. Reproduction and Breeding of Rhesus Monkey. Beijing: Science Press, 2013: 31-35
- [8] Johnson J, Canning J, Kaneko T, *et al*. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 2004, **428**(6979): 145-150
- [9] Zou K, Yuan Z, Yang Z, *et al*. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(5): 631-636
- [10] Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, *et al*. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, 2005, **122**(2): 303-315
- [11] White Y A, Woods D C, Takai Y, *et al*. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med*, 2012, **18**(3): 413-421
- [12] Hay B, Jan L Y, Jan Y N. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell*, 1988, **55**(4): 577-587
- [13] Styhler S, Nakamura A, Swan A, *et al*. vasa is required for GURKEN accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development*, 1998, **125**(9): 1569-1578
- [14] Schupbach T, Wieschaus E. Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev Biol*, 1986, **113**(2): 443-448
- [15] Gruidl M E, Smith P A, Kuznicki K A, *et al*. Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line-specific P granules of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(24): 13837-13842
- [16] Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*, 1997, **124**(16): 3157-3165
- [17] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(25): 12258-12262
- [18] Telfer E E, Gosden R G, Byskov A G, *et al*. On regenerating the ovary and generating controversy. *Cell*, 2005, **122**(6): 821-822
- [19] Bristol-Gould S K, Kreeger P K, Selkirk C G, *et al*. Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev Biol*, 2006, **298**(1): 149-154
- [20] Pacchiarotti J, Maki C, Ramos T, *et al*. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation*, 2010, **79**(3): 159-170
- [21] Reizel Y, Itzkovitz S, Adar R, *et al*. Cell lineage analysis of the mammalian female germline. *PLoS Genet*, 2012, **8**(2): e1002477

- [21] Bukovsky A, Caudle M R, Svetlikova M, *et al.* Oogenesis in adult mammals, including humans: a review. *Endocrine*, 2005, **26** (3): 301–316
- [22] Woods D C, Telfer E E, Tilly J L. Oocyte family trees: old branches or new stems?. *PLoS Genet*, 2012, **8**(7): e1002848
- [23] Zhang Y, Yang Z, Yang Y, *et al.* Production of transgenic mice by random recombination of targeted genes in female germline stem cells. *J Mol Cell Biol*, 2011, **3**(2): 132–141
- [24] Hu Y, Bai Y, Chu Z, *et al.* GSK3 inhibitor-BIO regulates proliferation of female germline stem cells from the postnatal mouse ovary. *Cell Prolif*, 2012, **45**(4): 287–298
- [25] Notarianni E. Reinterpretation of evidence advanced for neo-oogenesis in mammals, in terms of a finite oocyte reserve. *J Ovarian Res*, 2011, **4**(1): 1–20
- [26] Abban G, Johnson J. Stem cell support of oogenesis in the human. *Hum Reprod*, 2009, **24**(12): 2974–2978
- [27] Zhang H, Zheng W, Shen Y, *et al.* Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(31): 12580–12585
- [28] Woods D C, White Y A, Tilly J L. Purification of oogonial stem cells from adult mouse and human ovaries: an assessment of the literature and a view toward the future. *Reprod Sci*, 2013, **20**(1): 7–15
- [29] Mathe G. Immunity aging. I. The chronic perduration of the thymus acute involution at puberty? Or the participation of the lymphoid organs and cells in fatal physiologic decline?. *Biomed Pharmacother*, 1997, **51**(2): 49–57
- [30] Bukovsky A, Caudle M R, Svetlikova M, *et al.* Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, **2**(1): 20–30
- [31] Bukovsky A, Keenan J A, Caudle M R, *et al.* Immunohistochemical studies of the adult human ovary: possible contribution of immune and epithelial factors to folliculogenesis. *Am J Reprod Immunol*, 1995, **33**(4): 323–340
- [32] Bukovsky A. Oogenesis from human somatic stem cells and a role of immune adaptation in premature ovarian failure. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2006, **1**(3): 289–303
- [33] Lee H J, Selesniemi K, Niikura Y, *et al.* Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol*, 2007, **25**(22): 3198–3204
- [34] Begum S, Papaioannou V E, Gosden R G. The oocyte population is not renewed in transplanted or irradiated adult ovaries. *Hum Reprod*, 2008, **23**(10): 2326–2330
- [35] Eggen K, Jurga S, Gosden R, *et al.* Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*, 2006, **441** (7097): 1109–1114
- [36] Bukovsky A. Can ovarian infertility be treated with bone marrow- or ovary-derived germ cells?. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005, **3**(1): 36–38
- [37] Selesniemi K, Lee H J, Niikura T, *et al.* Young adult donor bone marrow infusions into female mice postpone age-related reproductive failure and improve offspring survival. *Aging (Albany NY)*, 2009, **1**(1): 49–57
- [38] Evans H M, Swezy O. Ovogenesis and the normal follicular cycle in adult mammalia. *Cal West Med*, 1932, **36**(1): 60
- [39] Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle M R. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005, **3**(1): 17–29
- [40] Woods D C, Tilly J L. The next (re)generation of ovarian biology and fertility in women: is current science tomorrow's practice?. *Fertil Steril*, 2012, **98**(1): 3–10
- [41] Oatley J, Hunt P A. Of mice and (wo)men: purified oogonial stem cells from mouse and human ovaries. *Biol Reprod*, 2012, **86**(6): 1–2
- [42] 范衡宇, 佟超, 孙青原. 核糖体 S6 蛋白激酶 p90^{sk} 与卵母细胞减数分裂. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29**(4): 506–509
- [43] Fan H Y, Tong C, Sun Q Y. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29**(4): 506–509
- [44] Longo F J. An ultrastructural analysis of spontaneous activation of hamster eggs aged *in vivo*. *Anat Rec*, 1974, **179**(1): 27–55
- [45] Xu Z, Abbott A, Kopf G S, *et al.* Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1, 4, 5-trisphosphate sensitivity. *Biol Reprod*, 1997, **57**(4): 743–750
- [46] Novak I, Lightfoot D A, Wang H, *et al.* Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells*, 2006, **24**(8): 1931–1936
- [47] Tedesco M, Farini D, De Felici M. Impaired meiotic competence in putative primordial germ cells produced from mouse embryonic stem cells. *Int J Dev Biol*, 2011, **55**(2): 215–222
- [48] Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, *et al.* Offspring from oocytes derived from *in vitro* primordial germ cell-like cells in mice. *Science*, 2012, **338**(6109): 971–975
- [49] 付玉华, 周秀梅, 徐凤青, 等. 诱导多潜能干细胞(iPSCs)的研究与应用进展. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(2): 101–112
- [50] Fu Y H, Zhou X M, Xu F Q *et al.* *The Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(2): 101–112
- [51] Marques-Mari A I, Lacham-Kaplan O, Medrano J V, *et al.* Differentiation of germ cells and gametes from stem cells. *Hum Reprod Update*, 2009, **15**(3): 379–390
- [52] 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?. *Mol Hum Reprod*, 2009, **15**(7): 393–398

Germline Stem Cells in Female Mammals: Moving on in Controversy*

CHEN Zhong-Liang, YANG Shi-Hua**

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract Whether germline stem cells exist in postnatal female mammal ovaries has been disputed for more than one hundred years and not conclusive yet. In 2004, researchers found and isolated female germline stem cells (FGSCs) from postnatal mice, which challenged the viewpoint of existing nearly half a century that the bank of oocytes in ovaries will be never renewed in postnatal mammal female. And then a lot of researches not only pointed out that the *de novo* oocytes derived from FGSCs, but also found that if the FGSCs were delivered back into adult ovaries, they were capable of generating functional eggs produced healthy offsprings. However, some groups repeated or designed experiments carefully, but they did not get the same or even opposite results. Recently, some researchers announced that they had purified FGSCs from ovaries of reproductive-age women, which could produce functional oocytes *in vivo* and *in vitro*, but the fertilization competency of these oocytes still need to be clarified. Therefore, this paper reviews the study history of mammalian FGSCs, the long-standing controversy as well as prospects for the future use of these FGSCs.

Key words female germline stem cells, ovaries, bone marrow, mammals

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00017

* This work was supported by grants from The Major Scientific Problem-oriented Project of Major Scientific Research Projects in The Ministry of Science (2012CBA01300), Program for New Century Excellent Talents in The Ministry of Education (NCET-12-1078), The National Natural Science Foundation of China (31071279, 30871232), Innovation Talents of Science and Technology Project in Yunnan Province (2011CI009).

**Corresponding author.

Tel: 86-13708768761, E-mail: yshhm@163.com

Received: March 4, 2013 Accepted: April 3, 2013