

人羊膜上皮细胞向卵泡样结构转分化的实验研究*

王慧^{1,2}, 王飞³, 白莉平^{1,2}, 莫小雨^{1,2}, 唐慧芸^{1,2}, 郑艾^{1,2△}

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室
(四川大学)(成都 610041); 3. 陕西省人民医院(西安 710000)

【摘要】 目的 研究人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)在人卵泡液的长时间刺激下能否转分化为卵泡样结构。**方法** 在前期实验结果基础上,体外分离培养 hAECs, 5% 人卵泡液为诱导条件, 延长诱导时间至 44 d, 倒置显微镜观察细胞形态学改变, 化学发光免疫技术检测培养基上清液中雌激素(estradiol, E₂)水平的变化, 实时荧光定量-聚合酶链式反应(real time-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测雌性生殖细胞特异性基因(GDF9、DAZL、SCP3)表达情况。**结果** 诱导组(添加有 5% 卵泡液的培养基)在培养第 10 天出现卵母细胞样细胞(OLCs), 随着时间延长, OLCs 体积增大, 周围见透明带样环变, 随后减小, 部分消失; 对照组无上述现象。诱导组 DAZL 及 GDF9 的 mRNA 表达水平较对照组升高($P < 0.05$), 并且具有两个高峰; 诱导组 SCP3 mRNA 表达水平与对照组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。诱导组有 E₂ 生成, 其水平随时间先下降后升高再下降; 对照组无 E₂ 生成。**结论** 在体外, hAECs 具有向卵泡样结构转分化的潜能。

【关键词】 人羊膜上皮细胞 人卵泡液 转分化 雌性生殖细胞 卵泡样结构 雌激素

Trans-differentiation of Human Amniotic Epithelial Cells into Follicle-like Structure WANG Hui^{1,2}, WANG Fei³, BAI Li-ping^{1,2}, MO Xiao-yu^{1,2}, TANG Hui-yun^{1,2}, ZHENG Ai^{1,2△}. 1. Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of Education (Sichuan University), Chengdu 610041, China; 3. People's Hospital in Shaanxi Province, Xi'an 710000, China

△ Correspondence author, E-mail: zazheng716@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To determine whether hAECs can differentiate into follicle-like structure. **Methods** hAECs were isolated from human term placenta and cultured sequentially in medium supplemented with 5% human follicular fluid. The morphology of the cells was examined by inverted microscope. Changes of estradiol levels and expressions of germ cell specific gene in the cultured medium were detected by chemiluminescence immunoassay and Real time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), respectively. **Results** Oocyte-like cells (OLCs) were found in those cultured in the medium supplemented with 5% human follicular fluid. The OLCs gradually aggrandized, shrunk and finally disappeared over time. However, this phenomenon was not observed in the control group. Higher expressions of DAZL and GDF9 were found in the follicle group compared with the control which medium without 5% human follicular fluid ($P < 0.05$), with two peaks. No significant difference in the expression of SCP3 was found between the two groups ($P > 0.05$). Estradiol was detected in the culture medium of the follicle group in a mode of decreasing-rising-decreasing, but not in the control group. **Conclusion** hAECs have the potential to trans-differentiate into the follicle-like structure in vitro.

【Key words】 hAECs Human follicle fluid Trans-differentiation Female germ cell Follicle-like structure Estradiol

近年来,妇科恶性肿瘤在世界范围内的发病率越来越高,且出现年轻化趋势^[1-2]。妇科恶性肿瘤常用的治疗仍以手术为主,再辅以放化疗,治疗后最为突出的并发症为卵巢结构或功能受损所致的不孕和低雌激素水平相关的围绝经期综合征。为解决这些问题,亟需寻求一种与体内雌激素效价、代谢途径等相一致的天然或近天然雌激素及一种新的生殖细胞来源。

研究表明源于废弃人胎盘组织的人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)既具有干细胞多向分化的“可塑性”,又弥补了干细胞取材困难、资源缺乏、致瘤风险及伦理学限制等缺点。研究证实 hAECs 能表达 Nanog 及 Oct-4(多能干细胞特异性转录因子),在适宜条件下能分化为内、中、外三胚层不同类型的细胞^[3-4]。hAECs 在体外能分化为内胚层源性的肝细胞样细胞^[5]及胰腺 B 样细胞^[6],中胚层的心肌细胞^[3]、脂肪细胞、软骨细胞^[4]及骨样细胞等^[7]以及外胚层的神经元细胞^[3,8]。目前尚无 hAECs 分化为雌性生殖细胞的

* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2011SZ0137) 资助

△ 通信作者, E-mail: zazheng716@yahoo.com.cn

报道,故本课题旨在研究 hAECs 在人卵泡液的刺激下能否转分化为雌性生殖细胞或卵泡样结构。

本课题前期研究^[9]表明人卵泡液在体外可诱导 hAECs 失去上皮细胞特有的铺路石样外观,并融合呈集落样生长;诱导组的生长分化因子 9(GDF9)及无精症缺失基因(DAZL)表达较对照组明显增高,本实验在此基础上延长诱导时间,从形态学和基因水平上观察 hAECs 的变化,观察是否有雌性生殖细胞生成及卵泡样结构产生,以及能否分泌雌性激素。

1 材料和方法

1.1 组织来源及主要试剂

1.1.1 组织来源 本实验中所用胎盘组织取自于四川大学华西第二医院产科,行剖宫产术后健康孕妇的胎盘组织,输血免疫检测均为阴性,排除经阴道分娩、胎膜早破等有感染可能或合并其他任何妊娠合并症者。人卵泡液取自四川大学华西第二医院辅助生殖技术中心体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)助孕的妇女,经阴道取卵过程中,抽取优势卵泡卵泡液。选择对象均为因单纯输卵管病变引起不孕,排除卵巢早衰等因素影响。本实验经患者知情同意,并经华西医院医学伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 低糖培养基、胎牛血清、人上皮生长因子(Gibco 公司),胰蛋白酶(Amreseco),硫酸链霉素、青霉素,非必需氨基酸、 β -巯基乙醇、谷氨酰胺、肝素钠,PCR 引物、TRIzol Reagent(Invitrogen 公司),Real-time PCR 试剂盒(Toyobo);超净工作台、CO₂ 细胞培养箱、超低温冰箱,恒温水浴箱,倒置相差显微镜(Olympus),小型台式离心机、低温高速离心机,实时荧光定量 PCR 仪,紫外分光光度仪、电泳仪、凝胶成像分析系统、酶标仪等。

1.1.3 主要试剂的配置

1.1.3.1 人卵泡液的制备 将获得的人卵泡液分装入 50 mL 无菌离心管放入离心机中,以 3 000 r/min 的转速在 4 ℃ 下离心 30 min;在无菌操作台用滴定管取出离心后的离心管上清液;0.22 μ m 蓝色滤器连续过滤两次除菌,分装,置于 4 ℃ 备用。

1.1.3.2 DMEM 基础培养基 低糖 DMEM 干 1 袋,HEPES 2.4 g,NaHCO₂ 2.4 g,左旋谷氨酰胺 0.29 g,丙酮酸钠 100 mg,青霉素 0.12 g,链霉素 0.14 g。

1.1.3.3 实验组培养基 无菌条件下,在 93 mL 的 DMEM 基础培养基中加入 10% 胎牛血清 5 mL、

55 μ m β -巯基乙醇 180 μ L、5% 人卵泡液 5 mL、肝素钠 800 U 和 1% 非必需氨基酸 1 mL。

1.1.3.4 对照组培养基 无菌条件下,在 88 mL 的 DMEM 基础培养基中加入 10% 胎牛血清 5 mL、55 μ m β -巯基乙醇 180 μ L、肝素钠 800 U 和 1% 非必需氨基酸 1 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 引物由 Invitrogen 公司合成。GDF9 上游引物:5'-TTCTATCTGTTGGGCG AGGT-3',下游引物:5'-AGCCGAACAGTGTGT AGAGG -3', 145 bp; DAZL 上游引物:5'-GGACC GAAGCATACAAACG-3',下游引物:5'-ATTTA AGCATTGCCCGACT-3', 137 bp; 联合复合体蛋白 3(synaptonemal complex protein 3,SCP3) 上游引物:5'-AAATCTGGGAAGCCGTCTGT-3',下游引物:5'-CCCTTCAATAACATCTTCCTCTG-3', 105 bp; 内参 β -actin 上游引物:5'-ACTATCGG CAATGAGCGGTTC-3',下游引物:5'-ATGCCAC AGGATTCCATACCC-3', 77 bp。

1.2.2 hAECs 原代培养 健康产妇离体胎盘 1 个,平置于无菌操作盘中,剪去脐带,以脐带为中心作“十”字切口;从“十”字切缘分离羊膜和绒毛膜,钝性分离羊膜与绒毛膜,D-hank's 液反复冲洗,剪成小块,放入离心管(a)中,加入 0.05% 胰蛋白酶 37 ℃ 震荡消化 10 min,弃去上清液;向离心管(a)中加入 0.05% 胰蛋白酶 37 ℃ 震荡消化 30 min,随后用含 10% 血清的 DMEM 低糖培养基终止消化,将上清液移入另一离心管(b);再向离心管(a)加入 0.05% 胰蛋白酶 37 ℃ 震荡消化 30 min,随后用含 10% 血清的 DMEM 低糖培养基终止消化,将上清液移入另一离心管(c);将离心管 b、c 中的消化液通过 200 目筛网过滤,收集细胞悬液,200 $\times$ g 4 ℃ 低温离心机离心 10 min,去除上清液,向细胞沉淀中加入培养基,混匀,接种于培养瓶中,37 ℃、体积分数 5% CO₂ 无菌细胞培养箱中培养,2~3 d 后换液,待细胞长至 80%~90% 融合后传代。

1.2.3 hAECs 诱导分化 取细胞融合达 80%~90% 的第 1 代 hAECs,分为对照组(C 组)和诱导组(F 组)。诱导组中培养基加入 5% 人卵泡液,对照组中培养基不添加人卵泡液。每隔 2~3 d 换液一次,换液时收集培养上清液用于雌激素(E₂)含量检测,每天于倒置相差显微镜下观察两组细胞形态变化并通过图像处理软件测量结构大小,每隔 3~7 d 收集两组细胞总 RNA 和蛋白。

1.2.4 Real-time PCR 检测基因表达 TRIzol 试剂收集诱导组 and 对照组 RNA, 氯仿-异戊醇方法提取总 RNA, 以 Oligo 18 为非特异性引物, 按照 Eva Green Real-time PCR 试剂盒(TOYOBO)说明书合成 cDNA. 定量 PCR 仪(BIO-RAD)上完成 PCR 扩增, 扩增条件: DAZL 基因 95 ℃ 2 min, 95 ℃ 10 s, 56 ℃ 10 s, 72 ℃ 15 s, 共 39 个循环; GDF9 基因、SCP3 基因和 β -actin 95 ℃ 2 min, 95 ℃ 10 s, 58 ℃ 10 s, 72 ℃ 15 s, 共 39 个循环. 琼脂糖凝胶电泳观察扩增产物纯度及 DAZL 基因、GDF9 基因和 SCP3 基因的表达情况. 基因水平以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示.

1.2.5 培养基上清液中 E₂ 测量 于 -20 ℃ 冻存对照组和实验组培养上清液, 冰上解冻后, 离心机顺势震荡混匀, 应用化学发光免疫技术检测上清液中 E₂ 含量.

1.3 统计学方法

所有实验均重复 3 次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示. 采用

One-way ANOVA 进行多组间比较, 采用独立 *t* 检验完成两组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 hAECs 诱导培养过程中形态学改变

培养第 7 天时, 诱导组部分细胞失去多角形态, 近似球形, 融合呈集落样生长; 对照组细胞形态无变化, 仍保持上皮细胞特有的形态特征. 培养第 10 天时, 诱导组培养瓶中出现卵母细胞样细胞(OLCs), 体积比周围细胞大, 呈卵圆形, 周围可见一层透明带样物质包绕; 对照组培养瓶中没有此现象. 随着培养时间延长, 诱导组透明带样环变得明显, OLCs 体积逐渐增大, 呈圆形, 最大可达 40 μm ; 随后透明带样物质逐渐变薄, 崩解, OLCs 体积变小、变形, 部分消失; 对照组没有此现象(图 1). 培养过程中 OLCs 直径的变化: 培养第 10 天到第 25 天 OLCs 的直径逐渐增大, 培养第 25 天到第 33 天逐渐减小, 差异有

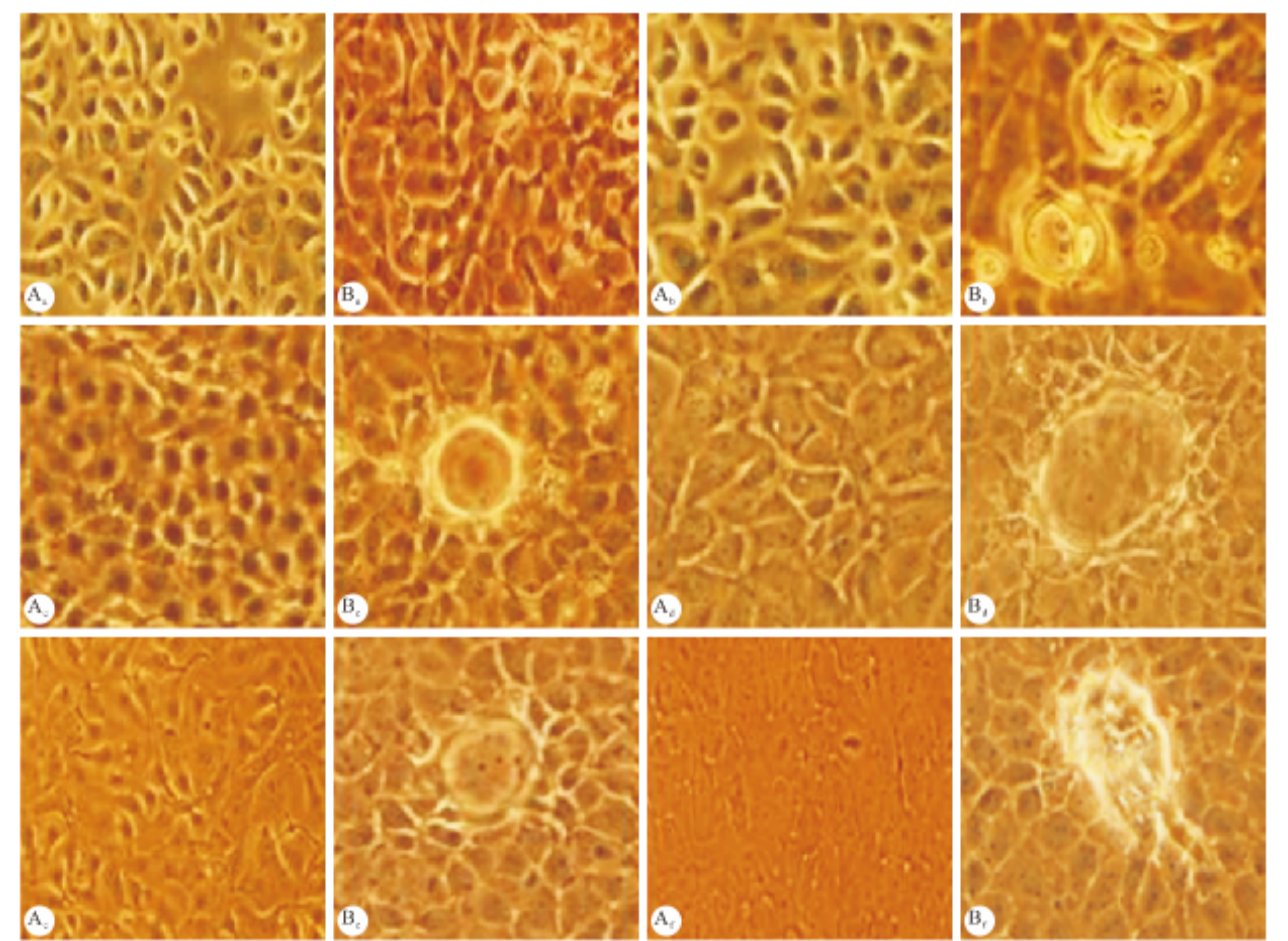


图 1 hAECs 诱导培养过程中不同时间点细胞形态学改变

Fig 1 Morphological change of hAECs after induction (200)

A: Control group; B: Follicle group; a: 7th day; b: 10th day; c: 17th day; d: 15th day; e: 33rd day; f: 44th day

统计学意义($P<0.05$)(图 2)。

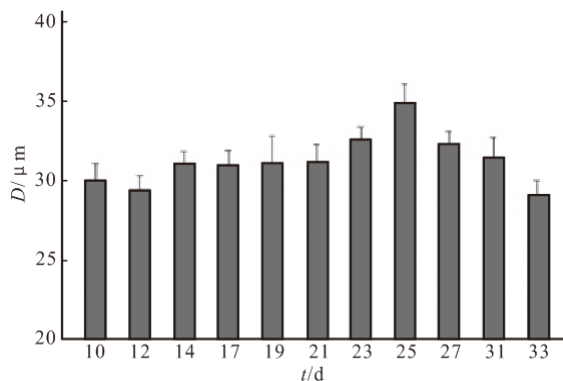


图 2 诱导过程中 OLCs 的直径变化

Fig 2 Changes in the diameter of OLCs during the induction

2.2 RT-PCR 检测生殖细胞特异性基因的表达

图 3~图 5 显示,诱导组细胞 *DAZL* 及 *GDF9* 的 mRNA 表达水平较对照组升高,差异有统计学意义($P<0.05$);诱导组 *SCP3* mRNA 表达水平与对照组之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。从时间上看,诱导组 *DAZL* mRNA 水平在第 10 天达到高峰,之后下降;又在第 21 天时回升,最后再降低;第 21 天时水平低于第 10 天,差异有统计学意义($P<0.05$);*GDF9* mRNA 水平变化趋势与 *DAZL* 相似,第 21 天时高于第 10 天,差异有统计学意义($P<0.05$);诱导组 *SCP3* 培养第 21 天时表达量开始增高,差异有统计学意义($P<0.05$),之后 *SCP3* 表达量无明显变化。对照组中 *SCP3* mRNA 水平变化与诱导组相似,但 *DAZL* 和 *GDF9* mRNA 水平无

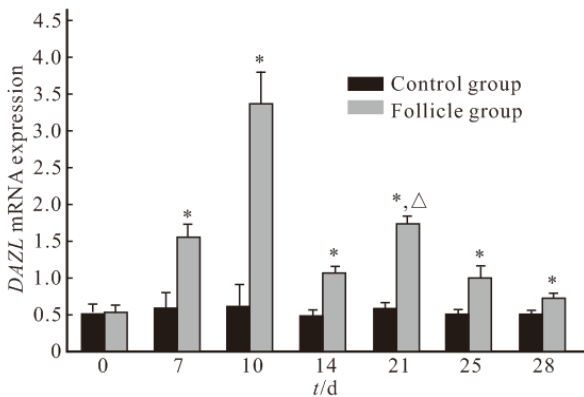


图 3 RT-PCR 检测生殖细胞特异基因 *DAZL* 的表达变化

Fig 3 Detection of germ cell special gene expression *DAZL* by RT-PCR

* $P<0.05$, vs. control group; △ $P<0.05$, vs. 10 d in the same group

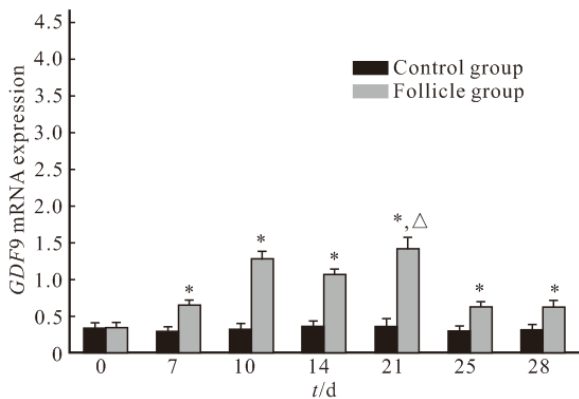


图 4 RT-PCR 检测生殖细胞特异基因 *GDF9* 的表达变化

Fig 4 Detection of germ cell special gene expression *GDF9* by RT-PCR

* $P<0.05$, vs. control group; △ $P<0.05$, vs. 10 d in the same group

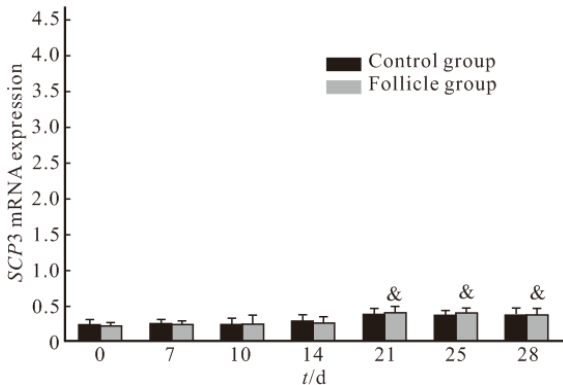


图 5 RT-PCR 检测生殖细胞特异基因 *SCP3* 的表达变化

Fig 5 Detection of germ cell special gene expression *SCP3* by RT-PCR

& $P<0.05$, vs. 0-14 d in the same group

明显变化。总体上看,*GDF9* 的平均表达量低于 *DAZL*,*SCP3* 的平均表达量低于 *DAZL* 和 *GDF9*。

2.3 培养上清液中 E_2 水平的变化

E_2 水平的变化见图 6,诱导过程中,对照组无 E_2 生成;诱导组培养基(添加有人卵泡液)中 E_2 基础水平约为 $(1.75 \pm 0.09) \times 10^4$ pg/mL(图中以 0 d 标记),至培养第 5 天时培养基中 E_2 水平降至 $(1.03 \pm 0.06) \times 10^4$ pg/mL,然后转而增加,至第 19 天达到最高峰 $(4.03 \pm 0.06) \times 10^4$ pg/mL,之后 E_2 水平逐渐下降。其中第 19 天时培养上清液中 E_2 水平与其他时间 E_2 水平相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。

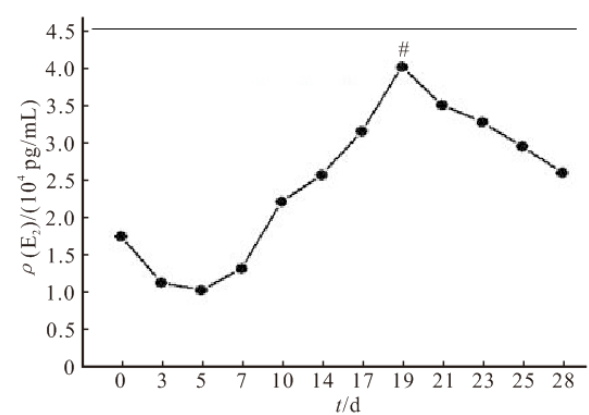


图 6 培养上清液中 E₂ 水平的变化

Fig 6 E₂ concentration in the spent media during different time

$P<0.05$, vs. the other time points

3 讨论

本课题前期实验从基因蛋白水平和 E₂ 生成方面推测人卵泡可诱导 hAECs 向雌性生殖细胞方向转分化,但诱导过程中未发现有卵细胞样细胞或卵泡样结构生成。故本实验进一步延长诱导时间,从形态学和基因水平上观察 hAECs 的变化,观察是否有雌性生殖细胞生成及卵泡样结构产生,以期为卵巢功能衰竭患者寻求雌性激素来源,为卵母细胞移植及卵巢组织再生奠定基础。

hAECs 的可塑性介于胚胎干细胞及成体干细胞之间。2003 年及 2006 年, HUBNER 和 DYCE 分别将鼠胚胎干细胞及胎猪皮肤干细胞分化为 OLCs^[10-11]。本实验诱导组中在培养第 10 天时开始出现 OLCs,比周围细胞大,卵圆形或圆形,周围可见一层薄的透明带样物质包绕,直径 30~40 μm,较正常卵母细胞小(正常卵母细胞直径 50~70 μm)^[12],而对照组中未见到 OLCs 产生。随着诱导时间延长,其直径逐渐增大,呈圆形,透明带样环更加明显;随后,透明样物质变薄、解体,卵母样细胞变小,变形,部分消失。由此可推测,hAECs 分化过程中可能有卵泡样结构形成。

DAZL 基因是减数分裂前生殖细胞的标志基因^[13]。GDF9 是卵母细胞特异性标志物,为卵巢卵泡发育过程中的必需因子^[14]。SCP3 为组成减数分裂过程中联会复合体的轴侧重要原件,染色质样附着在 SCP3 上,启动第一次减数分裂的发生,可见 SCP3 可作为鉴定哺乳动物卵母细胞是否进入第一次减数分裂过程的特异性标志物^[15]。本实验发现诱导组生殖细胞特异性基因 DAZL、GDF9 mRNA

表达水平明显高于对照组,而在延长诱导时间过程中诱导组 SCP3 mRNA 表达水平与对照组仍然无差异。从时间上看,诱导组 DAZL mRNA 水平先升高后下降,随后再复升,最后再降低,第二高峰低于第一高峰;GDF9 mRNA 水平变化趋势与 DAZL 相似,第二高峰高于第一高峰。本实验中诱导组生殖细胞特异性基因表达明显高于对照组,从基因转录水平上推测 hAECs 可能分化为卵母细胞;但是两组间 SCP3 表达差异无统计学意义。1965 年, EDWARDS 提出在卵细胞成熟的生理过程存在种属差异,特别是最后的成熟阶段,因此,以其他哺乳类为研究对象获得的结论可能与人类有区别^[16]。在关于多能干细胞分化为卵母细胞的研究中,分化所获得的雌性生殖细胞均未超过生殖细胞早期阶段^[13]。也有研究报道人多能干细胞能产生单倍体雌性细胞,但所产生的单倍体雌性细胞既不具备卵母细胞的形态也不具有完成受精过程的能力,即具有体外卵母细胞成熟障碍的问题^[17]。综上,本实验获得的 OLCs 中的卵母细胞尚无进入第一次减数分裂的能力,且没有观察到 OLCs 进一步分化成熟的证据,推测本实验获得的 OLCs 处于原始生殖细胞阶段或始基卵泡阶段。此外,获得的 OLCs 存活时间短,获得率极低且具有随机性。

两种促性腺激素-两种细胞模型是雌激素合成的经典学说。胆固醇在卵泡膜细胞中合成雄激素,继而再在颗粒细胞中经过芳香化转化酶的作用而形成雌激素;前者需要黄体生成素参与,后者需要卵泡刺激素参与。本实验结果表示诱导组培养基中可检测到 E₂,最高可达 4.03×10^4 pg/mL;而对照组中未检测到有 E₂ 生成。由此推测:hAECs 在向 OLCs 分化过程中,可能形成卵泡膜细胞及颗粒细胞而产生雌激素,提供了生理性激素来源,使天然激素替代治疗(HRT)成为可能。但本实验诱导组培养基中所检测到的雌激素水平低,仅相当于青春期前或绝经期女性的卵巢功能,故仍需进一步研究如何促进体外 OLCs 及卵泡样结构成熟,以期获得正常的生殖功能及内分泌功能。WANG 等^[12]将 hAECs 通过尾静脉注射到化疗致卵巢早衰的小鼠模型上,待两月后,观察提示 hAECs 能分化为颗粒细胞并促进卵泡再生,今后有待应用于人体提高女性癌症术后存活者生殖健康及生活质量。

本实验证明 hAECs 具有向卵泡样结构转分化的潜能,为卵巢功能衰竭或结构缺如患者行激素替代治疗及辅助生殖技术治疗带来希望。但是,本实

验所获得的雌激素量少并且尚未检测到 OLCs 进一步分化成熟的证据,在后续实验中需进一步深入研究、优化、完善及还原雌性生殖细胞生长发育的微环境,应用干细胞标志物及流式细胞学等技术分选出质量高的干细胞、优化 hAECs 的分离方法、采用颗粒细胞共培养、实时调整培养基中的激素比例等措施,促进 OLCs 进入减数分裂过程,促进其进一步分化成熟,促进卵泡发育和成熟,增加雌激素合成。

参 考 文 献

- [1] WHO. Initiative for vaccines research team of the department of immunization, vaccines and biologicals (2009) Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2009.
- [2] PARKHURST JO, VULIMIRI M. Cervical cancer and the global health agenda: Insights from multiple policy-analysis frameworks. *Glob Public Health*, 2013, 8(10):1093-1108.
- [3] MIKI T, LEHMANN T, CAI H, *et al.* Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, 2005, 23(10):1549-1559.
- [4] ILANCHERAN S, MICHALSKA A, PEH G, *et al.* Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod*, 2007, 77(3):577-588.
- [5] TEE JY, VAGHJIANI V, LIU YH, *et al.* Immunogenicity and immunomodulatory properties of hepatocyte-like cells derived from human amniotic epithelial cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2013, 8(1):91-99.
- [6] Szukiewicz D, Pyzlak M, Stangret A, *et al.* Decrease in expression of histamine H2 receptors by human amniotic epithelial cells during differentiation into pancreatic beta-like cells. *Inflamm Res*, 2010, 59(Suppl 2):S205-S207.
- [7] JIAWEN S, JIANJUN Z, JIEWEN D, *et al.* Osteogenic differentiation of human amniotic epithelial cells and its application in alveolar defect restoration. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(12):1504-1513.
- [8] Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, *et al.* Differentiation factors that influence neuronal markers expression *in vitro* from human amniotic epithelial cells. *Eur Cell Mater*, 2010, 19:22-29.
- [9] 王 飞, 刘小菁, 王 慧, 等. 体外诱导羊膜上皮细胞转分化为雌性生殖细胞的初步实验研究. *四川大学学报(医学版)*, 2013, 44(3):357-361.
- [10] HUBNER K, FUHRMANN G, CHRISTENSON LK, *et al.* Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, 2003, 300(5623):1251-1256.
- [11] DYCE PW, WEN L, LI J. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol. Nature cell biology*, 2006, 8(4):384-390.
- [12] WANG F, WANG L, YAO X, *et al.* Human amniotic epithelial cells can differentiate into granulosa cells and restore folliculogenesis in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(5):124[2016-11-02]. <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/srct335>. doi: 10.1186/srct335.
- [13] KEE K, ANGELES VT, FLORES M, *et al.* Human *DAZL*, *DAZ* and *BOULE* genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature*, 2009, 462(7270):222-225.
- [14] AZARI M, KAFI M, EBRAHIMI B, *et al.* Oocyte maturation, embryo development and gene expression following two different methods of bovine cumulus-oocyte complexes vitrification. *Vet Res Commun*, 2017, 41(1):49-56.
- [15] LI Y, HE Z, SHI S, *et al.* Scp3 expression in relation to the ovarian differentiation in the protogynous hermaphroditic ricefield eel *Monopterus albus*. *Fish physiol Biochem*, 2016, 42(6):1609-1619.
- [16] GONZALEZ-ORTEGA C, PINA-AGUILAR RE, CANCINO-VILLAREAL P, *et al.* Birth after human chorionic gonadotropin-primed oocyte *in vitro* maturation and fertilization with testicular sperm in a normo-ovulatory patient. *J Hum Reprod Sci*, 2016, 9(3):210-212.
- [17] EGUIZABAL C, MONTSERRAT N, VASSENA R, *et al.* Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem cells*, 2011, 29(8):1186-1195.

(2016-11-07 收稿, 2017-03-12 修回)

编辑 汤 洁