

# 与衰老相关的母源性生育力下降

崔龙波<sup>①</sup> 孙方臻<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> 烟台大学生物化学系 烟台 264005; <sup>②</sup> 中国科学院遗传与发育生物学研究所 北京 100080)

**摘要:** 老龄妇女与雌性动物生育力下降和丧失的原因包括卵母细胞库减少以及卵巢、输卵管和子宫的结构和功能障碍,但由减数分裂错误引起的卵母细胞质量下降是与衰老相关的母源性生育力下降的主要原因之一。卵母细胞的减数分裂错误主要表现为非整倍性和染色单体提前分离。本文主要综述了影响母源性生育力的各种因素、老龄动物卵母细胞减数分裂错误的原因、纺锤体和染色体改变的机制以及小鼠作为研究妇女年龄与生育力相互关系的动物模型等问题。

**关键词:** 年龄;生育力;卵母细胞

中图分类号:Q419 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)01-114-05

## Ageing-related Decline in Female Fertility

CUI Long-Bo<sup>①</sup> SUN Fang-Zhen<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai 264005;

<sup>②</sup> Laboratory of Molecular Developmental Biology, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

**Abstract:** The decline and loss of female fertility in human and animals is likely due to the diminishing pool of ovarian follicles and structural and functional abnormality of ovary, oviduct and uterus. However, poor oocyte quality derived from meiotic errors is one of the major causes for the ageing-related decline in female fertility. The meiotic errors of the oocytes affect female fertility by causing abnormal spindle assembly, chromosome aneuploidy and premature chromatid segregation. This paper reviews various factors that cause oocyte abnormality in ageing animals and the use of mouse as an animal model for studying the relationship between woman age and fertility.

**Key words:** Age; Fertility; Oocyte

与衰老相关的母源性生育力下降已得到广泛承认,但老龄妇女和雌性动物生育力下降的原因和机制一直是许多研究及争议的主题,由减数分裂错误引起的卵母细胞质量下降被认为是与衰老相关生育力下降的主要原因之一,其它引起生育力下降的原因包括卵母细胞数量的减少以及卵巢、输卵管和子宫的结构与功能障碍等诸多因素。对这些因素已进行了广泛的研究,已经取得了一些结论性的成果,但也有些结果却是相互矛盾的。

### 1 卵母细胞质量下降引起的生育力下降

卵母细胞在遗传学及生物学方面受到年龄的影响,其中由减数分裂错误所导致的非整倍性增加和染

色单体早现被认为在与衰老相关的卵母细胞质量下降方面起有主要作用。

**1.1 非整倍性增加** 在人,卵母细胞和胚胎非整倍性的比率随母体年龄增长而显著增加<sup>[1]</sup>,Eichenlaub-Ritter<sup>[2]</sup>统计了4 000多个老龄人的M II期卵母细胞,其中8.6%为超倍性,13.5%为低倍性,因此保守的估计(非整倍性相当于2倍超倍体的水平)有17.2%的卵母细胞染色体异常,在估计整个非整倍性水平时若也算

基金项目 国家973项目(No. G1999055902)资助;

第一作者介绍 崔龙波,男,博士,教授,研究方向:发育生物学和细胞生物学;E-mail: lbctui@163.com。

收稿日期:2004-04-15;修回日期:2004-10-30

上低倍性则有 20% 以上的卵母细胞染色体异常。考虑到 M II 期卵母细胞的非整倍性仅反映了第一次减数分裂错误的程度,完成第二次减数分裂后非整倍性的比率在老龄个体会更高。少数鼠系如 CBA/Ca 小鼠的卵母细胞和胚胎随年龄增长非整倍性有显著的增加,但比较人而言,幅度较低<sup>[3,4]</sup>。由母体衰老而导致的母源性超倍性的发生率大致保持在 1.5% ~ 5.2% 的范围<sup>[4]</sup>,小鼠非整倍性的发生不象人那样随母体年龄增长而陡然增加。然而,多数品系小鼠卵母细胞并不显示与年龄相关的非整倍性上升<sup>[5]</sup>。

**1.2 染色单体早现** Angell 等<sup>[6]</sup>并没有发现卵母细胞的染色体数异常,而是在 M II 期卵母细胞发现一或几条单个染色单体,早现的染色单体在老龄妇女出现的比率显著高于年轻妇女。Sakurada 等<sup>[7]</sup>发现 XO 鼠系 M II 期卵母细胞分散的单条染色单体的发生增加,该鼠系后代有高比率的染色体非整倍性,故推测早现的染色单体分离可能引起胚胎非整倍性。Eichenlaub-Ritter 等<sup>[8]</sup>报道老龄小鼠 M II 期卵母细胞染色体数异常的比例显著高于年轻小鼠,同时高比例 ( $P < 0.001$ ) 的老龄小鼠卵母细胞在 M II 期含一条或几条染色单体,有儿例在卵母细胞本身和第一极体都见到单条的染色单体,因此,染色单体分离应该发生在后期 I,而不是发生于卵母细胞停滞在 M II 期时。由于重组的同源染色体在第一次减数分裂通过交叉结合在一起, M II 期单条染色单体的出现意味着交叉在前期 I 期间提早消退,单价体里的染色单体在偶线期就定向,在后期 I 发生均等而不是减数分离(提前分离)<sup>[2]</sup>。还有另外一种情况,同源染色体不能重组可能引起老龄卵母细胞中单价体的出现,因此易发生染色单体提前分离<sup>[2]</sup>。

除上述提及的非整倍性和染色单体提前分离引起卵母细胞质量下降外,卵母细胞与凋亡有关的 DNA 断裂也可能是老龄小鼠和人卵母细胞质量下降和生育力降低的原因之一<sup>[9,10]</sup>。

## 2 减数分裂错误的原因

母体衰老与减数分裂错误之间的关系已被关注了许多年,然而在生殖细胞形成期间染色体分离错误增加的病因和机制仍不十分清楚。过去几十年间,已提出许多学说来解释母体衰老对染色体分离错误的影响。大多数学说基于这一事实:哺乳动物减数分裂停滞于胎儿卵巢的核网期,直至成年排卵前才恢复,这一漫长的核网期在有些卵母细胞持续到母体生殖末期,即小鼠到 2 岁、人到 50 岁。由于非整倍性胚胎和后代的发生率随年龄增长而增加,故认为在这一漫长的核

网期卵母细胞的变化增加了染色体分离错误的发生率。Henderson 和 Edwards<sup>[11]</sup>提出了所谓“生产线”(production line)学说:非整倍性是由在胎儿发育期间卵母细胞发育的顺序预先确定了,在胎儿发育期间早早形成的卵母细胞将在出生后早早排卵,最后形成的、含甚少交叉和甚多单价体的卵母细胞在生命后期最后排出,单价体可能导致染色体分离错误而产生非整倍性卵母细胞。随后几十年间这一学说受到很多争议。Lamb 等<sup>[12]</sup>则提出了“双击”(two-hit)学说:减数分裂错误主要是因同源染色体重组改变的结果,这一改变称为第一击,引起重组数的上升和下降,第二击可以是干扰减数分裂的任何事情,如构建减数分裂器的蛋白质。有关减数分裂器特别是纺锤体的退化对非整倍性的影响下面将进一步叙述。此外,接近生殖寿命末期激素失衡作为非整倍性病因学的一个可能因素在老龄个体也被提出<sup>[13]</sup>。

**2.1 减数分裂器的改变** 为了解染色体分离紊乱导致老龄动物卵母细胞非整倍性增加的机制,Eichenlaub-Ritter 等<sup>[14]</sup>比较了不同鼠龄卵母细胞的 M II 期纺锤体,发现纺锤体长度与母体年龄有关,老龄小鼠 M II 期纺锤体明显短于年轻小鼠,相反,老龄小鼠卵母细胞的染色体紊乱和移位很明显。因此,卵母细胞非整倍性倾向的一个更为直接的指标似乎是纺锤体结构正常与否及染色体排列的有序程度,因为与接近生殖末期小鼠的后代非整倍性发生增加相一致,老龄小鼠卵母细胞呈现高比率的纺锤体变短和染色体移位。老龄动物 M II 期卵母细胞纺锤体里染色体排列的紊乱反映了第一次减数分裂期间染色体分离的紊乱,或表明这些卵母细胞在第二次减数分裂期间染色单体分离易发生错误<sup>[2]</sup>。Liu 和 Keefe<sup>[15]</sup>比较了年轻和老龄 SAM 小鼠 GV 期卵母细胞的减数分裂过程,结果也表明 M I 和 M II 期的纺锤体崩解和/或染色体错排与 SAM 小鼠的母体衰老有关。Battaglia 等<sup>[16]</sup>对人 M II 期卵母细胞做了同样研究,以检查母体年龄对减数分裂器的影响:在年轻人,大多数卵母细胞染色体均匀排列在中期板内,纺锤体形态均匀一致,而在老龄人,大多数卵母细胞纺锤体或形状异常或微管散乱,一条或几条染色体明显从中期板移位。结果表明在人卵母细胞,母体衰老与减数分裂纺锤体异常之间有明显的关联。由于纺锤体装配和染色体排列异常的比率如同非整倍性一样随母体年龄增长而增加,因此作者认为老龄人卵母细胞负责减数分裂纺锤体组装的调控机制明显改变,导致非整倍性的发生增加。

**2.2 染色体的改变** Liu 和 Keefe<sup>[15]</sup>观察到,老龄小鼠

卵母细胞的染色体错排既可发生在完整的纺锤体上、又可发生在紊乱的纺锤体上,表明减数分裂纺锤体在没有正常的染色体排列时也能形成。所以,染色体异常本身不能决定纺锤体的完整性,另一方面紊乱的纺锤体通常表明染色体错排或缺陷。不难理解与紊乱的纺锤体有关的染色体错排,但很难理解与正常的纺锤体有关的染色体错排。很有可能 DNA 损伤和染色体异常扰乱了染色体在纺锤体上的排列,因此,除纺锤体结构外,染色体本身在非整倍性的起始也有重要作用<sup>[15]</sup>。在 Mlh1 突变体雌鼠观察到异常 M I 表明染色体能影响减数分裂纺锤体组装<sup>[17]</sup>。然而,纺锤体紊乱并非意味着是染色体异常阻止了完整纺锤体的形成,很有可能在衰老期间所发生的氧化应激既损伤 DNA 又损伤微管,然而 DNA 应比微管更容易受到氧化应激的损伤。因此,老龄小鼠减数分裂的纺锤体紊乱和/或染色体错排可能是由于染色体功能异常、细胞质缺氧和/或氧化应激直接或间接对 DNA 及纺锤体的损伤引起的<sup>[15]</sup>。

**2.3 纺锤体和染色体改变的机制** 老龄动物的卵母细胞恢复减数分裂前在卵巢内停滞很长时间,在这漫长的时间里,各种各样内在和外源的因素可以引起纺锤体前体的降解和染色体损伤,其中与线粒体有关的氧化应激是一主要因素。Friedman 等<sup>[18]</sup>报道卵泡液中血管内皮生长因子(VEGF)随年龄而增加,而缺氧与高浓度的 VEGF 有关。缺氧直接引起或再充氧后间接引起氧化应激产生。氧化应激损伤衰老期间的 DNA 和染色体及蛋白质<sup>[19]</sup>,这些蛋白质可能涉及到对纺锤体组装重要的微管和小分子。许多染色体相关或着丝粒相关的蛋白质,如 Mps1、Mad2 和 Xkid,已表明在染色体于纺锤体中期板上的排列发挥重要作用<sup>[15]</sup>。除线粒体功能障碍和氧化应激外,卵泡内 pH 的改变(长时间停滞在核网期的卵母细胞内的非特异性衰老过程)亦能引起纺锤体前体的降解和染色体损伤。总之,老龄个体减数分裂异常可能是许多因素损伤了纺锤体和染色体成分和/或改变了减数分裂各时期的时序,导致纺锤体紊乱和染色体排列异常。

**2.4 纺锤体检验点的改变** 在有丝分裂,纺锤体检验点使细胞停滞以应对有丝分裂纺锤体组装的缺陷或染色体排列的错误,当纺锤体形成抑制或染色体脱离赤道板时,大多数有丝分裂的体细胞停滞在 M 期。检验点存在于大多数类型细胞,以保证细胞周期进程中事件的有序性,即复制完成后才能进入 M 期,纺锤体出现/染色体凝集后才过渡到后期<sup>[20]</sup>。然而在老龄小鼠卵母细胞,尽管染色体错排,仍不能阻止减数分裂从 M I

前进到 M II,减数分裂似乎带着错误进行,表明在卵母细胞衰老过程中,减数分裂缺乏一个负责染色体排列和纺锤体完整性的检验点或修复机制,脆弱的减数分裂检验点可能是引起小鼠衰老相关生育力下降的主要因素<sup>[15]</sup>。

### 3 其它引起生育力下降的因素

**3.1 卵母细胞数量、成熟及受精的改变** 妇女生育力随年龄而下降,其原因之一是自胎儿发育期间建立起的卵母细胞储备库的逐渐减少<sup>[21]</sup>。随着女性的衰老,即使在激素刺激后,所获得的卵母细胞数量也渐进性下降。小鼠及其它哺乳动物也呈现类似的变化,由老龄 SAM 小鼠卵巢中收集的卵丘细胞-卵母细胞复合体数明显少于年轻小鼠,表明老龄小鼠卵巢资源减少<sup>[15]</sup>。其他研究者也表明,随着母体年龄的增加,收集到的 G V 期卵母细胞<sup>[22, 23]</sup>、M II 期卵母细胞<sup>[9, 23]</sup>或受精卵<sup>[4]</sup>数逐渐下降。然而,对此也有相反的报道,在小鼠<sup>[24]</sup>和大鼠<sup>[25]</sup>所排出的卵母细胞数没有呈现与衰老相关的下降。

Tarin 等<sup>[23]</sup>发现老龄小鼠 G V 期卵母细胞体外成熟到 M II 期的百分比下降。其他研究也表明母体衰老与卵母细胞体外成熟和排出第一极体的能力下降有关<sup>[10]</sup>。然而,对此也有相反的报道。从大的有腔卵泡分离卵母细胞时,与老龄小鼠比较,年轻小鼠有更多的卵母细胞停滞在核网期,不能成熟,二者差异显著<sup>[2]</sup>。尽管老龄 SAM 小鼠有 45% 的卵母细胞在 M I 期显示纺锤体破裂和/或染色体错排,但其体外成熟率仍达 88%,与年轻 SAM 小鼠卵母细胞的成熟率(92%)无显著差异<sup>[15]</sup>。

有研究显示随母体年龄增长,不仅收集到的卵母细胞数减少,而且卵母细胞的体外受精率也下降<sup>[9, 10]</sup>。Ishikawa 和 Endo<sup>[24]</sup>报道,老龄小鼠排卵的延续时间明显长于年轻和中年小鼠,结果老龄小鼠在排卵末期排出的卵母细胞在卵泡内成熟过度,这可能影响受精率和胚胎正常发育,因此导致与衰老相关的后代出生数下降。然而, Sakurada 等<sup>[4]</sup>指出老龄小鼠的受精卵数明显低于年轻小鼠,受精率虽有下降,但不显著。尽管随年龄增长,从小鼠中收集的卵母细胞数明显减少,但卵母细胞体外受精、卵裂和发育到囊胚的比率在高达 18 月龄时也未见实质性改变<sup>[22]</sup>。对人的研究也表明年轻和老龄妇女的受精率无差异,但其妊娠率却有显著差异<sup>[26]</sup>。

**3.2 卵巢、输卵管及子宫的改变** Harman 和 Talbert<sup>[27]</sup>发现 10~11 月龄小鼠平均着床数少于对照组(4~7 月

龄),这一减少伴有妊娠黄体的形态学退化,到 12~13 月龄,大多数小鼠在交配后 7.5 d 既没有着床,也没有可见的妊娠黄体,着床率与黄体退化密切相关。由于老龄与年轻小鼠的排卵数相似,因此作者认为小鼠生殖功能的衰老性下降与卵巢衰退有关,是由退化的黄体不能支持子宫而引起的。Brinsko 等<sup>[28]</sup>指出老龄马输卵管正常功能有所改变,由此可能会影响输卵管捕获或运输卵母细胞因而干扰了受精和胚胎发育的正常过程。受精卵移入老龄小鼠子宫的着床率明显少于移入年轻小鼠的子宫,而来自年轻和老龄小鼠的卵母细胞在年轻小鼠的子宫同样生存良好,这些结果表明子宫环境缺陷而不是卵母细胞缺陷引起老龄小鼠生育力的下降<sup>[29]</sup>。在人,也有研究表明与衰老相关的子宫功能不全或子宫内膜接受性下降是生育力下降的原因<sup>[30]</sup>。然而,有些研究则表明老龄妇女的子宫能充分维持妊娠,即使生殖力延长到 40 岁后期,与衰老相关的女性生育力下降与子宫接受性无关<sup>[31]</sup>。

#### 4 小鼠作为研究母体年龄效应的动物模型

在人,女性生育力随年龄增长而下降是一个生理现象。如前所述,卵母细胞数量减少和质量低下是母体生育力与衰老相关的下降的主要原因。人们一直用小鼠作为研究人的母体年龄与生育力相互关联的动物模型。然而,早期的研究表明大多数鼠系与衰老有关的生育力下降归因于子宫而非卵母细胞功能异常<sup>[29]</sup>。在许多实验鼠系未观察到排出的卵母细胞数与年龄相关的下降<sup>[24,27]</sup>。此外,在生殖衰老期间,小鼠卵母细胞很少出现非整倍性<sup>[3,4]</sup>。这些现象表明许多鼠系不适宜做解决人类与衰老相关的卵母细胞不育症这一问题的模型。理想的动物模型是能研究人与生殖衰老相关的非整倍性及不育症。

CBA/Ca 小鼠可用做这一研究的模型<sup>[2]</sup>。CBA/Ca 雌鼠有相当短的生殖寿命,9 月龄时胚胎数量就开始下降,到 11 月龄时停滞排卵。与人相似但与其他近交鼠系不同,卵泡库在生殖寿命的末期耗尽,并显示与年龄相关的非整倍性的增加<sup>[3]</sup>,尽管明显低于人。然而,在年轻和老龄 CBA/Ca 小鼠的卵母细胞,MI 纺锤体和染色体排列的特征是完全一致的<sup>[14]</sup>,这对 CBA/Ca 小鼠作为研究人与年龄相关的非整倍性的模型引起争议。

衰老加速小鼠(senescence-accelerated mouse, SAM)是一作为衰老的动物模型而培育的纯种系,与正常小鼠比较表现出提早衰老<sup>[32]</sup>。SAM 在衰老早期便呈现线粒体功能异常和氧化损伤,线粒体功能异常已成为解

释衰老的主导理论。SAM 在 2~6 月龄时能正常生育,8 月龄时生育力显著下降,至 10 月龄时不再生育。老龄 SAM 小鼠卵母细胞数明显减少,且多数老龄小鼠卵母细胞呈现 MI 和 MII 纺锤体紊乱和/或染色体排列异常,很可能导致非整倍性。老龄 SAM 小鼠卵母细胞的严重紊乱可以更好地模拟人的情况, SAM 小鼠可以成为研究衰老相关不育症的一个有价值动物模型<sup>[15]</sup>。

我们对昆明白小鼠所做的研究工作表明,昆明白小鼠呈现与衰老相关的卵母细胞质量下降,表现在老龄小鼠 MII 期卵母细胞发生染色单体提前分离、纺锤体紊乱和/或染色体排列异常的数量明显增加。老龄小鼠 GV 期卵母细胞能正常体外成熟,老龄小鼠 MII 期卵母细胞经体外受精后形成原核期胚、2-细胞期胚和囊胚的比率与年轻小鼠比较无显著差异,但原核形成时间延迟 1 h;在老龄小鼠卵母细胞注射牛精子提取物或  $\text{Sr}^{2+}$  处理时所诱发的  $\text{Ca}^{2+}$  振荡以及在减数分裂成熟及早期胚胎中的  $\text{PKC}\alpha$  分布未发生改变\*。

#### 参 考 文 献

- [1] Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet*, 1985, **70**: 11~17.
- [2] Eichenlaub-Ritter U. Genetics of oocyte ageing. *Maturitas*, 1998, **30**: 143~169.
- [3] Eichenlaub-Ritter U, Boll I. Nocodazole sensitivity, age-related aneuploidy and alterations in the cell cycle during maturation of mouse oocytes. *Cytogenet Cell Genet*, 1989, **52**: 170~176.
- [4] Sakurada K, Ishikawa H, Endo A. Cytogenetic effects of advanced maternal age and delayed fertilization on first-cleavage mouse embryos. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, **72**: 46~49.
- [5] Zuccotti M, Boiani M, Garagna S, et al. Analysis of aneuploidy rate in antral and ovulated mouse oocytes during female ageing. *Mol Reprod Dev*, 1998, **50**: 305~312.
- [6] Angell R R, Xian J, Keith J. Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Hum Reprod*, 1993, **8**: 1047~1054.
- [7] Sakurada K, Omoe K, Endo A. Increased incidence of unpartnered single chromatids in metaphase II oocytes in 39, X(XO) mice. *Experientia*, 1994, **50**: 502~505.
- [8] Eichenlaub-Ritter U, Michel G, Betzendahl I. Predivision and altered maturation are implicated in maternal age-related errors in chromosome segregation in mammalian oogenesis. *Eur J Hum Genet*, 1998, **6**( Suppl ): 83.

\* 崔龙波等,昆明白小鼠与衰老相关的生育力下降研究,待发表。

- [ 9 ] Fujino Y , Ozaki K , Yamamasu S , *et al.* DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Hum Reprod* ,1996 **11** :1 480 ~ 1 483.
- [ 10 ] Wu J , Zhang L Z , Wang X Y. Maturation and apoptosis of human oocytes *in vitro* are age-related. *Fertil Steril* 2000 **74** : 1 137 ~ 1 141.
- [ 11 ] Henderson S A , Edward R G. Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature* ,1968 **218** 22 ~ 28.
- [ 12 ] Lamb N E , Freeman S B , Savage-Austin A , *et al.* Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* ,1996 **14** 400 ~ 405.
- [ 13 ] Crowley P H , Gulah D K , Hayden T L , *et al.* A chiasma-hormonal hypothesis relating Down 's syndrome and maternal age. *Nature* ,1979 **280** 417 ~ 418.
- [ 14 ] Eichenlaub-Ritter U , Chandley A C , Gosden R G. The CBA mouse as a model for age-related aneuploidy in man : studies of oocyte maturation , spindle formation and chromosome alignment during meiosis. *Chromosoma* ,1988 **96** 220 ~ 226.
- [ 15 ] Liu L , Keefe D L. Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. *Hum Reprod* 2002 , **17** 2 678 ~ 2 685.
- [ 16 ] Battaglia D E , Goodwin P , Klein N A , *et al.* Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* ,1996 **11** :2 217 ~ 2 222.
- [ 17 ] Woods L M , Hodges C A , Baart E , *et al.* Chromosomal influence on meiotic spindle assembly : abnormal meiosis I in female Mlh1 mutant mice. *J Cell Biol* ,1999 **145** :1 395 ~ 1 406.
- [ 18 ] Friedman G I , Danforth D R , Herbosa-Encarnacion C , *et al.* Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction. *Fertil Steril* ,1997 **68** 607 ~ 612.
- [ 19 ] Berlett B S , Stadtman E R. Protein oxidation in ageing disease and oxidative stress. *J Biol Chem* ,1997 **272** :20 313 ~ 20 316.
- [ 20 ] Elledge S J. Cell cycle checkpoints : preventing an identity crisis. *Science* ,1996 **274** :1 664 ~ 1 674.
- [ 21 ] Faddy M J , Gosden R G , Gougeon A , *et al.* Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life : implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* ,1992 **7** :1 342 ~ 1 347.
- [ 22 ] Eppig J J , O'Brien M. *In vitro* maturation and fertilization of oocytes isolated from aged mice : a strategy to rescue valuable genetic resources. *J Assist Reprod Genet* ,1995 **12** 269 ~ 273.
- [ 23 ] Tarín J J , Perez-Albala S , Cano A. Oral antioxidants counteract the negative effects of female ageing on oocyte quantity and quality in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2002 **61** 385 ~ 397.
- [ 24 ] Ishikawa H , Endo A. Prolongation of duration of ovulation in ageing mice. *J Reprod Fertil* ,1996 **108** :167 ~ 170.
- [ 25 ] Day J R , La Polt P S , Morales T H , *et al.* An abnormal pattern of embryonic development during early pregnancy in ageing rats. *Bio Reprod* ,1989 **41** 933 ~ 939.
- [ 26 ] Lim A S T , Tsakok F H. Age-related decline in fertility : a link to degenerative oocytes ? *Fertil Steril* ,1997 **68** 265 ~ 271.
- [ 27 ] Harman S M , Talbert G B. The effect of maternal age on ovulation , corpora lutea of pregnancy , and implantation failure in mice. *J Reprod Fertil* ,1970 **23** 33 ~ 39.
- [ 28 ] Brinko S P , Ball B A , Miller P G , *et al.* *In vitro* development of day 2 embryos obtained from young fertile mares and aged , subfertile mares. *J Reprod Fertil* ,1994 **102** 371 ~ 378.
- [ 29 ] Talbert G B , Krohn P L. Effect of maternal age on viability of ova and uterine support of pregnancy in mice. *J Reprod Fertil* , 1966 **11** 399 ~ 406.
- [ 30 ] Gostwamy R K , Williams G , Steptoe P C. Decreased uterine perfusion : a cause of infertility. *Hum Reprod* ,1988 **3** :955 ~ 959.
- [ 31 ] Navot D , Bergh P A , Williams M A , *et al.* Poor oocytes quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet* ,1991 **337** :1 375 ~ 1 377.
- [ 32 ] Takeda T , Hosokawa M , Higuchi K. Senescence-accelerated mouse ( SAM ) : a novel murine model of senescence. *Exp Gerontol* ,1997 **32** :105 ~ 109.