

卵泡发育的生物力学特性及其临床应用价值*

王可欣¹, 李琰华^{2**}

(1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 杭州 310053;
2. 浙江中医药大学附属第二医院全科医学科, 杭州 310005)

【摘要】 卵泡发育过程中卵巢环境高度变化, 从而为其提供一个生物力学上允许的环境。本文描述了原始卵泡池休眠及激活、卵泡生长和排卵等动态过程中卵巢生物力学特性、细胞外基质、卵泡的形态及功能的变化, 从而影响信号转导的调节。此外, 论述了生物机械微环境改变及机械信号转导失调在多囊卵巢综合征、早发性卵巢功能不全等卵巢生殖内分泌疾病发生中的关键病理作用。同时, 探讨通过靶向改变卵巢生物力学环境从而恢复生育能力的治疗策略, 旨在为临床研究及诊治提供参考。

【关键词】 卵巢卵泡; 细胞外基质; 河马信号通路; 多囊卵巢综合征; 生物力学

中图分类号: R711.75 文献标志码: A 文章编号: 1004-7379(2024)05-0393-05

DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2024.05.011

依据卵泡的形态和功能特征, 哺乳动物卵泡发育过程可分为始基卵泡、初级卵泡、次级卵泡、窦卵泡和排卵前卵泡。排卵前卵泡(又称为格拉夫卵泡)释放卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complex, COC)后完成排卵, 最后转变为黄体。除了公认生物化学信号、低氧环境刺激外, 生物力学环境对原始卵泡的休眠和激活也至关重要^[1]。本文叙述了在卵泡发育过程中, 细胞外基质的变化规律、Hippo 和 Akt 通路作为重要信号调节通路的作用与机制以及常见的卵巢疾病(多囊卵巢综合征及早发性卵巢功能不全)的异常卵泡生物发育学的病理改变。

1 细胞外基质

卵巢细胞外基质(extracellular matrix, ECM)发挥多种作用, 可为卵巢提供组织功能所必需的结构完整性和力学特性, 如强度和刚度, 还可调节细胞功能, 如细胞黏附、迁移、增殖和分化以维持组织稳态^[2]。ECM 是由胶原蛋白、蛋白聚糖/氨基聚糖、弹性蛋白、纤维连接蛋白、层粘连蛋白和其他 ECM 相关蛋白组成的动态三维大分子支架。成纤维细胞几乎存在于所有哺乳动物器官组织间质中, 对 ECM 的分泌、组装和重塑至关重要。基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinase family, MMP)至少由 28 个成员组成, 它们降解 ECM 中约 20% 的组分。基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(metalloproteinase tissue inhibitor-1, TIMP-1)通过与 MMP-2 结合, 有效降低 MMP-2 的活性, 从而抑制 MMP-2 对 ECM 的降解^[3]。因此, MMP 和 TIMP 之间的动态平衡可维持 ECM 在组织器官中的正常表达和沉积水平。过度的 ECM 沉积则会对组织功能产生负面影响, 产生间质性肺病、肝纤维化等疾病^[4]。

最近一项蛋白质组学分析了人类卵巢皮质中 ECM 的成分, 该研究检测到了 85 种基质体蛋白, 其中胶原蛋白最丰富, 占 49%, 并以胶原蛋白 VI 为主^[5]。研究发现, 在体外受精过程中, 刚性较大的培养基(如 1.5% 海藻酸钠)会阻碍卵泡的生长, 而过于柔软的生物材料(如 1g/L 胶原蛋白)不能提供必要的三维支撑, 导致颗粒细胞错误地增殖并迁移到周围环境中^[6]。据此, Woodruff 提出了以 ECM 硬度变化为基础的卵泡发育假说: ECM 硬度较大的皮质区限制卵泡生长, 使得卵泡保持静止休眠状态, 从而成为原始卵泡的主要驻留区。当生长的卵泡逐渐迁移到髓质区时, ECM 环境变得相对柔软和柔韧, 从而有利于卵泡发育^[7]。这一假说获得了相当多证据支持。Fiorentino 等^[8]将三维微计算机断层扫描技术(microCT)和对比成像相结合, 将成年小鼠的卵巢进行 3D 重建, 观察到了小鼠卵巢的内部结构、主要卵巢动脉分支, 以及处在不同卵泡发育周期的卵泡的 3D 位置映射。该研究发现, 卵泡募集均匀地发生在小鼠卵巢八个部分的皮质中, 然后卵泡开始向着髓质生长, 直到它们发育成窦状卵泡后又重新回到皮质区, 从而完成排卵等一系列事件。Grosbois 等^[9]对人卵巢皮质活检组织进行了体外培养, 发现了 ECM 在培养过程中的动态重塑。原始卵泡活化伴随着卵巢皮质的松动, 表现为基质细胞密度从 D0 的 $(3.6 \pm 0.2) \times 10^6$ cells/mm³ 下降至 D2 的 $(2.8 \pm 0.1) \times 10^6$ cells/mm³, 胶原蛋白含量在 D0 ~ D2 下降后保持稳定, 弹性蛋白含量则逐渐增加并在 D6 达到峰值, 而纤连蛋白及层粘连蛋白含量则保持相对稳定。胶原蛋白赋予组织硬度和拉伸强度, 能抵抗变形和破裂, 弹性蛋白则赋予延展性和可逆性回缩。亚区分析显示, 外皮质区

* 基金资助: 浙江省卫生厅医药卫生科技计划项目 (No: 2020KY67)

** 通信作者 Email: liyanhua0330@163.com

胶原沉积量最大,中皮质区胶原沉积最少,阳性面积分别为(69.4±1.2)%和(53.8±0.8)%。而弹性蛋白主要分布于皮-髓质交界处。

除了卵巢周期外,卵巢 ECM 特性也随着时空变化而改变。研究发现,卵巢组织硬度随着年龄的增长而增加,并且胶原蛋白含量增加,而透明质酸含量下降是造成卵巢硬化的主要原因。年轻小鼠的卵巢硬度为(1.79±0.08)kPa,老龄小鼠的卵巢硬度则为(4.56±2.03)kPa。在离体条件下,使用胶原酶处理生殖老龄小鼠的卵巢后,这些小鼠卵巢中的胶原蛋白含量和生物力学性能(2.28±0.61)kPa 恢复到年轻对照组的水平^[10]。这也可解释从青春期到更年期女性卵泡激活率的下降。Oumi 等^[11]在青春期前女孩的原始卵泡和初级卵泡周围检测到较高的胶原水平和较低的弹性蛋白含量,表明相较于育龄期,青春期前卵泡受到的机械力水平较高。有趣的是,尽管在育龄妇女的卵巢组织中发现其总体胶原蛋白含量高于青春期前女孩,但用偏光显微镜观察到后者的原始卵泡区域被更高比例的厚胶原纤维包围。这种生态位造成青春期前卵泡的激活、生长的停滞,更倾向于静止状态。

2 卵泡发生

2.1 原始卵泡池的休眠和激活

机械力在维持原始卵泡中卵母细胞的休眠状态中起关键作用。虽然哺乳动物卵巢中存在数以万计的卵泡,但大多数卵泡会休眠数年或数十年。每一个卵巢周期中,一批卵泡被激活进入发育期,但最终只有一个优势卵泡可彻底成熟,完成排卵。始基卵泡是女性的基本生殖单位,卵泡的发育始于始基卵泡的活化。直到窦卵泡阶段,卵泡发育才受到垂体分泌的促性腺激素的调控。在卵泡发育过程中,颗粒细胞的形态逐步从扁平状转变到立方状。用胶原酶处理后,始基卵泡的颗粒细胞又恢复成立方形。这一变化提示具有更大表面张力的扁平状颗粒细胞向卵母细胞施加压应力可能是卵母细胞维持休眠状态的关键因素之一^[1]。此外,始基卵泡中的卵母细胞核处于旋转状态,位于卵巢边缘卵泡的旋转频率高于内侧卵泡。用胶原酶处理后核旋转停止,向卵巢施加外源性压力后核旋转再次恢复。在此基础上,Nagamatsu 等^[12]认为核旋转可能参与调节卵泡休眠的阈值。

细胞可感知 ECM 力学特性的变化,并通过力学信号转导途径作出反应,从而调节细胞行为。Hippo 和 Akt 信号通路已被确定为始基卵泡活化即初始招募阶段的两个重要调节通路。

2.1.1 Hippo 通路

哺乳动物 Hippo 通路由 MST1/2 (mammalian STE20-like protein kinase 1/2)、SAV1 (salvador 1)、MOB1 (MOB kinase activator protein 1) 和 LATS1/2 (large tumor-suppressor homolog) 以及下游效应因子 Yes 相关蛋白 (yes-associated protein, YAP) 和 PDZ 结合域的转录共刺激因子 (transcriptional coactivators with PDZ-binding motif, TAZ) 组成。Hippo 通路的这些核心成分控制着细胞增殖、存活、移动性、干性和分化的转录程序。Hippo 通路受到内在和外在信号的严格调控,如机械力、细胞-细胞接触、细胞极性、能量状

态等,其中大多数通过 G 蛋白偶联受体起作用^[13]。卵母细胞在休眠状态下被物理压缩,即外界机械力较大时,被颗粒细胞膜上的整合素机械感受器所识别,继而 Hippo 通路被激活,MST 和 SAV1 形成异二聚体磷酸化并激活 LATS1/2-MOB1 复合体,磷酸化 YAP/TAZ。在 14-3-3 蛋白作用下,YAP 被束缚在细胞质中,最终通过蛋白酶体途径被降解,使得卵泡维持静止状态。相反,当 ECM 被降解后,卵母细胞尺寸迅速扩大,Hippo 信号通路被抑制,未被磷酸化的 YAP/TAZ 进入细胞核并与 TEA 转录因子 (TEA domain transcription factors, TEAD) 相互作用,驱动下游靶基因的转录及表达,如结缔组织生长因子 2 (cellular communication network factor 2, CCN2)、杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列包含蛋白 3 (baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing protein 3, BIRC3),从而促进细胞增殖,使得静止卵泡池被激活^[14]。

2.1.2 PI3K/AKT 通路

叉头框转录因子 3 (forkhead box O3, FOXO3) 是维持卵泡池休眠状态的关键转录因子。FOXO3 过表达使卵母细胞难以生长发育,而敲除 FOXO3 基因则加速卵母细胞的生长,导致卵巢早衰^[13]。当外界机械力较大时,张力蛋白同源物 (tensin homolog deleted from chromosome 10, PTEN) 将 PIP3 去磷酸化为 PIP2,进而 Akt 通路被抑制,促进 FOXO3 的核定位。始基卵泡周围的 ECM 被降解时,颗粒细胞激活雷帕霉素靶蛋白,并通过 Kit 配体与其在卵泡膜上的酪氨酸蛋白激酶受体 (tyrosine kinase receptor, TKr) 相结合,从而磷酸化并激活 Akt。磷酸化的 Akt 磷酸化转录因子 FOXO3 导致 FOXO3 的细胞质定位增加,从而促进卵泡激活。Akt 途径还在 MST1 处抑制 Hippo 激活,从而促进卵泡激活和生长。使用 MK2206 (AKT 抑制剂) 不仅可抑制卵泡激活,而且可致 YAP 磷酸化增加^[14]。

2.2 卵泡的发育

生长中的卵泡受周围环境的机械力作用,在卵泡发生过程中表现出自身力学特征的变化。在次级卵泡中,颗粒细胞分裂增殖使细胞层数增至 6~8 层,基质板可能会变形或主动重塑从而为其提供机械屏障。次级卵泡同时还受到颗粒细胞层的径向压应力和膜细胞层的切向拉应力。窦卵泡形成的关键形态学事件是在窦卵泡中出现充满液体的腔。液腔可产生流体静压,可调节细胞-细胞连接或离子泵活动,进而导致控制器官或组织的大小。但是目前关于卵泡腔在卵泡形成中的潜在机械化学机制仍未明^[15]。Chan 等^[16]通过布里渊显微镜发现,在窦卵泡阶段膜细胞比颗粒细胞具有更高的损耗角正切 (>20%)。损耗角正切可理解为细胞的有效微黏度与刚度之间的比率。因此,膜细胞的损耗角正切越高,黏性越大。这可能与膜细胞产生透明质酸有关,膜细胞充当机械“海绵”,以缓冲外部机械应力对卵母细胞和体细胞作用。

有研究使用原子力显微镜测定了卵巢中不同组分的杨氏模量。卵巢是一个相当柔软的组织,平均杨氏模量为(3.3±2.5)kPa,近似脂肪组织或肾脏的硬度。刚度最大的大卵泡杨氏模量大约为 7kPa,这提示大卵泡是卵巢中机械上占主导地位的结构,而非富含胶原的基质^[17]。以往观点认为优势

卵泡通过旁分泌或自分泌的形式,分泌雌激素和抑制素以负反馈的形式抑制垂体分泌卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH),从而阻碍其他卵泡继续发育,造成闭锁^[14]。而本研究认为,发育晚期的大型卵泡可能通过其机械优势激活 Hippo 通路,从而抑制周围小卵泡的发育,也挑战了传统观点认为卵巢微环境的硬度主要取决于 ECM 中胶原蛋白的含量。

2.3 排卵事件 ECM 的重塑,卵泡顶端抗张强度的降低,以及卵泡内压力的增加是排卵发生所必需的。排卵前黄体生成素(luteinizing hormone, LH)激增诱导卵泡细胞合成和分泌多种蛋白水解酶,如 MMPs 和纤溶酶,从而降解周围 ECM。片段化的 ECM 释放肿瘤坏死因子- α ,导致排卵前卵泡顶端上皮细胞的凋亡,形成排卵孔。而在远离卵泡破裂区域, MMPs 活性的抑制阻止了 ECM 的进一步断裂。为了使 COC 从卵泡膜壁中挤出,内皮素 2 扩散至膜外并触发平滑肌细胞的收缩,从而在卵泡最薄弱的地方(即顶端)引起破裂^[15]。一旦卵母细胞被排出,腔内压下降,卵泡壁塌陷,卵泡膜细胞毛细血管侵入颗粒层,从而形成黄体。

3 常见的卵巢疾病与卵泡生物发育学及治疗

卵泡、卵母细胞形态功能的改变,以及 ECM 和基质隔室的变化,都可能导致生育能力下降。回顾多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)和早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)中 ECM 组成、生化特性和血管功能的病理变化,并提供潜在的治疗策略,旨在纠正改变的生物力学特性和恢复生理性卵泡的发生。

3.1 PCOS 与卵泡生物发育学 PCOS 是育龄期女性中最常见的生殖、内分泌代谢疾病,以临床/生化高雄激素血症、排卵障碍(表现为月经不规律或停经)以及超声证实的多囊卵巢形态为特征。下丘脑-垂体-卵巢轴失调使得 GnRH 脉冲频率增加,促进 LH 并限制 FSH 分泌(LH:FSH 比值增加),导致卵泡膜细胞和颗粒细胞分别合成更多的雄激素以及抗苗勒管激素(anti-mullerian hormone, AMH),导致卵泡发育主要停滞在窦卵泡阶段。与健康卵巢相比,PCOS 中初级、次级和小型窦卵泡数增加了 2~6 倍^[18]。PCOS 的病理生理学特点主要包括:皮质增厚和间质增生、颗粒/膜细胞和周围基质组织增多;卵巢内血管生成功能障碍,包括卵巢基质血管化增加、血流阻抗降低和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达增加。据报道,多囊卵巢患者皮质间质的厚度增加了三分之一,而皮质间质厚度则增加了 5 倍^[19],可能与缺乏 ECM 降解或异常的 ECM 结构有关。

3.2 PCOS 治疗策略 直接减少或逆转卵巢基质的僵硬或抑制下游细胞对基质硬度的响应可能是治疗 PCOS 的潜在靶点。

3.2.1 卵巢楔形切除术和腹腔镜卵巢打孔术 腹腔镜卵巢打孔术(laparoscopic ovarian drilling, LOD)是卵巢楔形切除术的升级版。其效应主要是由以下两种机制产生的:(1) LOD 在非常厚的皮质中形成人造孔,造成十分致密和坚硬的皮质壁松动。(2)通过热效应破坏卵泡[卵泡膜和(或)颗粒细胞

数量减少],导致这些细胞和结构减少卵巢相关激素、免疫因子的合成,以及破坏部分卵巢基质从而降低 VEGF 表达和恢复卵巢正常血流^[20]。这些因素都有助于降低雄激素水平,使下丘脑-垂体-卵巢轴正常化,重新开始正常的卵泡发育周期,最后恢复自发排卵。一项荟萃分析显示,腹腔镜卵巢钻孔术联合或不联合药物促排卵治疗与单纯促排卵药物治疗相比,可能会降低氯米芬抵抗的无排卵 PCOS 妇女的活产率^[21]。目前尚不清楚单个卵巢穿刺几个部位能产生最佳的 LOD 治疗效果。相关病例也报告了 LOD 导致医源性粘连和卵巢储备功能下降的潜在风险^[20]。

3.2.2 肌动蛋白聚集剂 JASP (Jasplakinolide) 是一种促进肌动蛋白聚合的环肽,可促进球状肌动蛋白(G-actin)向丝状肌动蛋白(F-actin)的转化。而 S1P(sphingosin-1-phosphate)是卵泡液中的一种成分,可促进肌动蛋白聚合。用 JASP 或 S1P 处理人类卵巢皮质后, YAP 核定位增加,促进下游 CCN2 表达,从而刺激卵泡继续生长和成熟卵母细胞的形成^[18]。

3.2.3 透明质酸和抗纤维化药物 透明质酸是由透明质酸合成酶合成的高分子量聚合物,由于其聚合物链上带有很多负电荷,与水分子结合后可促进组织水合作用。哺乳动物卵巢的硬度随着年龄增长而增加,这与透明质酸酶表达增加和透明质酸合成酶表达下降有关。因此促透明质酸形成的药物可能对缓解 PCOS 有益^[10]。抗纤维化药物,如吡非尼酮和 BGP-15 可减少纤维化胶原并恢复老年育龄期和肥胖小鼠的排卵,这与抑制巨噬细胞向 M2 型极化和上调 MMP13 有关^[22]。

3.2.4 二甲双胍 二甲双胍(metformin, MET)是众所周知的 AMP 依赖的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)激活剂,AMPK 可直接激活 Lats1/2 或磷酸化 YAP 的 Ser 94 位点从而抑制 YAP 活性^[14]。研究发现,患有 PCOS 的妇女服用 MET 后,卵巢体积及血流量减少。MET 治疗保存了卵巢内皮细胞,并使 VEGF 和血管生成素 1 蛋白水平正常化,减少了卵泡囊肿的形成,促进卵泡成熟和排卵^[18]。此外, MET 治疗减少了绝经后卵巢中 M2 巨噬细胞极化和胶原沉积,减轻卵巢纤维化^[23]。

3.3 POI 与卵泡生物发育学 POI 也称为卵巢早衰或过早绝经,其定义是指卵巢功能在 40 岁之前停止。随着卵巢功能不全的进展,卵巢储备指标逐渐恶化,表现为促性腺激素水平升高, AMH、抑制素 B、雌二醇水平降低。氧化应激、DNA 损伤、线粒体损伤、免疫细胞功能障碍等一系列分子机制使得原始卵泡被大量激活或卵泡功能不全,造成颗粒细胞凋亡增加,卵泡发育停滞及闭锁增加。卵巢组织间质纤维化及血管生成受损(VEGF、IGF1 及血管生成素显著下调)。POI 患者卵巢皮质的生物力学特性具有很大的变异性,较高的组织硬度可能与更多的残留卵泡数有关^[24]。目前认为 Hippo 和 Akt 信号通路异常可能是 POI 的潜在病因^[18]。

3.4 POI 治疗策略 激素替代疗法是指通过补充性激素使其水平恢复到正常的绝经前水平,并预防慢性疾病的发生,如骨质疏松症和心血管疾病,但不能解决 POI 患者的不育问

题^[25]。因此,促进残余原始卵泡活化可能是治疗 POI 的有效策略。

3.4.1 体外激活 原始休眠卵泡的体外激活(in vitro activation, IVA)技术可能是治疗 POI 的新方法^[26]。研究表明,即使是卵巢皮质的简单碎裂也可中断 Hippo 通路,从而恢复卵泡的生长。基于这一原理,用 Akt 激活剂和 PTEN 抑制剂处理卵巢皮质小片段(1~2mm),促进 G-actin 向 F-actin 转化,中断 Hippo 信号从而促进原始卵泡激活和卵泡生长。无药物 IVA 也应运而生,在全麻下进行腹腔镜手术,部分切除一侧或双侧卵巢皮质。去除残留的骨髓组织,然后将其碎成小块(1cm×1cm×1cm),通过皮质和骨髓之间的通道移植到对侧卵巢,或移植到两侧输卵管下方的腹膜袋中^[27]。

3.4.2 间充质干细胞及细胞外囊泡疗法 间充质干细胞具有自我更新和分化的能力,在卵巢功能和生育能力的恢复方面有巨大潜力。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cell, hUCMSC)旁分泌肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)促进颗粒细胞 KITL 表达,上调 PI3K/Akt 通路以促进原始卵泡活化。体内追踪表明,移植的 hUCMSC 仅定位于卵巢间质而非卵泡。研究发现,将 hUCMSC 与自交联 HA 凝胶相结合,利用其黏弹性延长干细胞在卵巢中的滞留时间从而提高干细胞作用的有效性^[28]。细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一类由细胞分泌的脂质膜囊泡的统称,可在细胞之间转运分子货物。hUCMSC 衍生的 EVs 移植通过促进颗粒细胞增殖、细胞间通讯、卵母细胞纺锤体正常形态的形成,从而恢复性激素水平,增加血管生成和生长卵泡数^[29]。

4 小结和展望

ECM 对维持卵巢功能和调节卵泡发育至关重要,其不仅提供物理支撑,同时也参与细胞信号传导,其组成结构不断动态重塑以适应卵泡发育和扩张的需要。因此,生物力学和生物化学刺激在生物发育过程中并不是相互分离的,原始卵泡的休眠与激活、卵泡发育的空间位移、新血管生成和排卵事件都是生物力学和生物化学信号协调作用的结果。

目前的认识和研究仍存在以下不足:(1)卵泡发生过程中机械信号如何相互整合、力学和生物化学信号如何结合在一起影响细胞的各种行为,尚未有明确解释;(2)目前在体外培养模型中,研究细胞与 ECM 相互作用主要集中于二维空间。除了整合素和机械敏感离子通道外,目前尚不清楚机械信号在三维环境中是如何传导的;(3)卵巢皮质和髓质区域化的突出程度因物种而异,与人类卵巢相比,啮齿动物卵巢的皮质和髓质区域化明显降低。故在小鼠卵巢中的发现可能并不适用于人类卵巢^[30]。考虑到卵巢基质力学的异质性,未来研究还需要构建与卵巢基质力学异质性相匹配的更准确的体外培养环境,从而更好地理解生物力学对卵巢衰老、疾病及癌症中的作用。

参 考 文 献

[1] Hayashi K, Shimamoto S, Nagamatsu G. Environmental factors for establishment of the dormant state in oocytes [J]. *Dev Growth Differ*, 2020, 62(3):150-157

[2] Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. The extracellular matrix as a multitasking player in disease [J]. *FEBS J*, 2019, 286(15):2830-2869

[3] Zhou F, Shi LB, Zhang SY. Ovarian fibrosis: a phenomenon of concern [J]. *Chin Med J*, 2017, 130(3):365-371

[4] Chen G, Xia B, Fu Q, et al. Matrix mechanics as regulatory factors and therapeutic targets in hepatic fibrosis [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(12):2509-2521

[5] Ouni E, Vertommen D, Chiti MC, et al. A draft map of the human ovarian proteome for tissue engineering and clinical applications [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18 (Suppl 1):S159-S173

[6] Francés-Herrero E, Lopez R, Hellstrom M, et al. Bioengineering trends in female reproduction: a systematic review [J]. *Hum Reprod Update*, 2022, 28(6):798-837

[7] Woodruff TK, Shea LD. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2011, 28(1):3-6

[8] Fiorentino G, Parrilli A, Garagna S, et al. Three-dimensional micro-computed tomography of the adult mouse ovary [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:566152

[9] Grosbois J, Bailie EC, Kelsey TW, et al. Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during in vitro culture [J]. *Hum Reprod*, 2023, 38(3):444-458

[10] Amargant F, Manuel SL, Tu Q, et al. Ovarian stiffness increases with age in the mammalian ovary and depends on collagen and hyaluronan matrices [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(11):e13259

[11] Ouni E, Bouzin C, Dolmans MM, et al. Spatiotemporal changes in mechanical matrisome components of the human ovary from prepuberty to menopause [J]. *Hum Reprod*. 2020, 35(6):1391-1410

[12] Nagamatsu G, Shimamoto S, Hamazaki N, et al. Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(6):eaav9960

[13] Matsuzaki S. Mechanobiology of the female reproductive system [J]. *Reprod Med Biol*, 2021, 20(4):371-401

[14] Sun C, Yang X, Wang T, et al. Ovarian biomechanics: from health to disease [J]. *Front Oncol*, 2021, 11:744257

[15] Biswas A, Ng BH, Prabhakaran VS, et al. Squeezing the eggs to grow: the mechanobiology of mammalian folliculogenesis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10:1038107

[16] Chan CJ, Bevilacqua C, Prevedel R. Mechanical mapping of mammalian follicle development using Brillouin microscopy [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1):1133

[17] Hopkins TIR, Bemmer VL, Franks S, et al. Micromechanical mapping of the intact ovary interior reveals contrasting mechanical roles for follicles and stroma [J]. *Biomaterials*, 2021, 277:121099

[18] Fiorentino G, Cimadomo D, Innocenti F, et al. Biomechanical forces and signals operating in the ovary during folliculogenesis and their dysregulation: implications for fertility [J]. *Hum Reprod Update*, 2023, 29(1):1-23

[19] Kinnear HM, Tomaszewski CE, Chang FL, et al. The ovarian stroma as a new frontier [J]. *Reprod*, 2020, 160(3):R25-R39

[20] Seow KM, Chang YW, Chen KH, et al. Molecular mechanisms of laparoscopic ovarian drilling and its therapeutic effects in polycystic ovary syndrome [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21):8147