

颗粒细胞的增殖分化及其在卵泡发育中的作用

卢翠玲 杨巍 胡召元 刘以训*

(中国科学院动物研究所, 生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080. * 联系人, E-mail: liuyx@ioz.ac.cn)

摘要 颗粒细胞(GC)是卵巢中十分重要的细胞. 从原始卵泡生长启动、增殖、分化、闭锁/排卵到黄体形成, GC在形态、功能等方面都发生各种变化. 卵母细胞(OC)指导了GC的增殖、分化; 同时GC也影响OC的成熟. 有众多因子参与这个调节过程, 牵涉到复杂的分子作用机制和信号转导通路, 如p38 MAPK通路可选择性调控FSH对GC的甾体生成; 而转录因子LRH-1和DAX-1在该过程中可能发挥重要作用; FSH通过促进PCNA和StAR表达及甾体生成, 诱导GC的增殖和分化; 而ERK1/2通路的激活也可能参与FSH对GC增殖分化的诱导作用. 因此, GC是一个用以研究细胞增殖、分化和细胞相互作用及其信号转导通路和分子机制的十分理想的细胞模型. 本文评述了近几年国内外研究的最新进展.

关键词 颗粒细胞 卵母细胞 增殖 分化 凋亡 调控

原始卵泡由一层扁平的卵泡细胞和一个未分化卵母细胞(OC)组成. 它的启动生长分为2个阶段. 首先, 卵泡细胞由扁平变为立方形, 开始增殖, 并伴随卵泡抑素(follistatin)的表达. 随后, 形成由单层立方形的颗粒细胞(GC)和OC组成的初级卵泡. 初级卵泡的细胞迅速分化增殖形成次级卵泡, 此期的GC增殖为2~3层. 到三级卵泡, GC分化为多层, 并出现空腔. 此后, GC分化为两类细胞, 即围绕卵泡壁的壁颗粒细胞(mGC)和围绕OC的卵丘细胞(CC). 排卵后的卵泡细胞很快转化成黄体细胞(LC). 黄体化的GC形成大黄体细胞, 而黄体化的内膜细胞(TC)转化成小黄体细胞.

在卵泡发生的起始阶段, 卵泡细胞还没有形成功能型促性腺激素(FSH和LH)的受体, 所以卵泡生长启动是促性腺激素非依赖性的. GC和OC之间的对话和相互作用可能是卵泡启动生长的原因. 启动卵泡生长具体的信号分子机制仍不清楚. 干细胞因子(SCF)对此可能起重要作用^[1]. 卵泡启动生长之后, OC和GC分泌的因子以及来自血浆中的因子对调节卵泡的发育分化起了重要作用.

1 卵母细胞对GC生长分化的调节作用

OC分泌的因子, 指导GC的生长分化, 调控卵泡发育. 从出生12 d的次级卵泡分离的OC与来自原始卵泡的卵泡细胞一起共培养9 d, 发现有组合的卵泡形成, 其中一些组合的卵泡可发育到排卵前卵泡^[2], 这一发现表明, OC向GC传递“成熟信息”.

OC能够刺激腔前卵泡GC产生kit配基(KL)/SCF,

受体kit位于OC及TC. KL或kit缺失的小鼠, 卵泡发育和卵子发生出现异常. 分离新出生的大鼠卵巢, 离体后加入重组KL培养5~14 d, 生长启动的原始卵泡数较对照组有明显增多, 其作用可被c-kit抗体完全阻断^[3]. 当OC生长到足够大时, 可能来自OC的旁分泌信号便转为抑制信号, 抑制GC合成KL. 我们分离出生当天大鼠卵巢体外培养8 d, 发现SCF可以促进原始卵泡向初级卵泡转化, SCF可以通过上调抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-xL的表达, 显著抑制体外培养的卵巢中OC的凋亡(图1)^[4], 在此调控过程中可能有PI-3K/AKT信号通路的参与(图2)^[4], 证明早期发育卵泡的OC表达类固醇生成因子-1(SF-1)、甾类激素生成快速调节蛋白(StAR)和P450芳香化酶(P450 arom)mRNA, SCF能提高SF-1和StAR的表达水平, 并在基因水平上增加P450 arom的表达. 另外, SCF可以抑制GC中FSHR mRNA的表达. 总之, 在卵泡发育的早期阶段, SCF似乎可以刺激OC产生雌激素, 而抑制GC的分化, 而卵泡发育末期雌激素的主要来源是GC^[4]. 最近的研究报道, SCF和c-kit形成的复合体, 在卵巢发育整个过程中都是必需的. SCF和c-kit在维持黄体分泌孕酮过程中也起重要作用^[5,6].

SCF(KL)可以促进膜间质细胞(TIs)的ERK1/2磷酸化, 通过ERK1/2通路刺激膜间质细胞的功能促进早期卵泡生长.

OC分泌的TGF- β 家族的几个成员分子是近几年受关注的焦点之一, 特别是GDF-9(生长分化因子-9), BMP-15(骨髓形态发生蛋白-15, 也称为GDF-9B), BMP-6等. 在卵泡发生早期, 到形成次级卵泡之前,

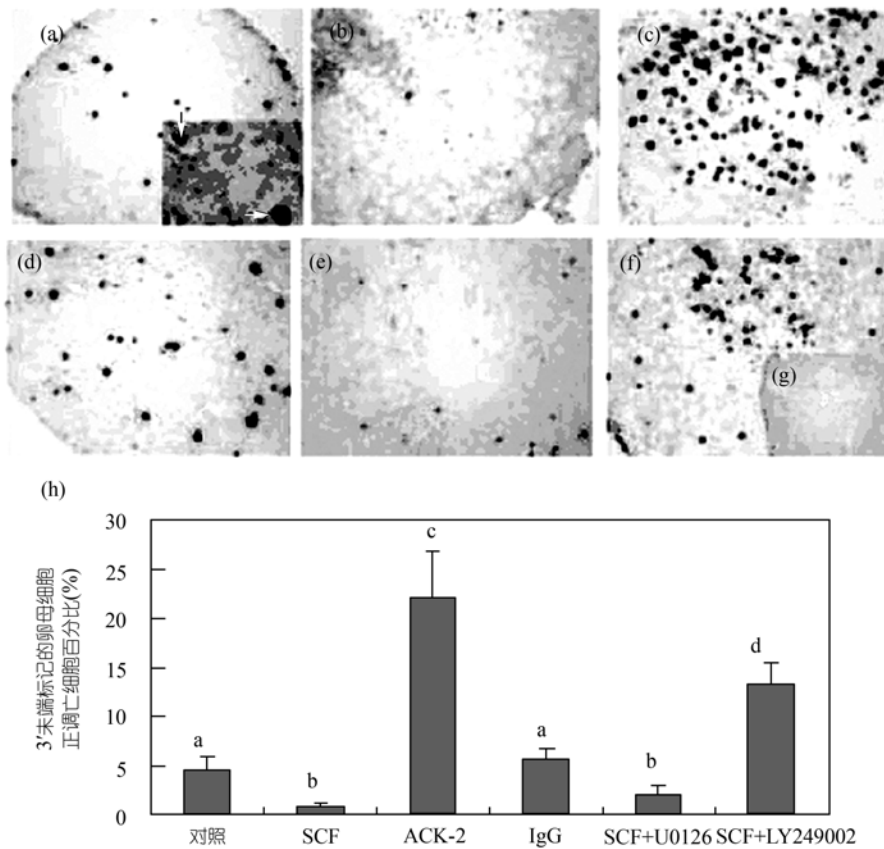


图1 SCF对体外培养卵巢的抗凋亡作用(引自金萱等人^[11])

(a)~(g) 原位 3' 末端标记凋亡的核。(a) 未经处理的卵巢。高倍镜放大显示凋亡染色定位在卵母细胞核(箭头所示)。(b) 100 ng/mL SCF 处理 2 d; (c) SCF加 c-kit抗体处理。(d) SCF加IgG (e) SCF加MEK的抑制剂U0126; (f) SCF加PI-3K的抑制剂LY294002。(g) 不加SCF, 用正常血清IgG处理的卵巢作阴性对照。放大倍数 400×(小图 1000×)。(h) 对不同处理的卵巢凋亡卵母细胞进行统计分析。纵坐标为卵母细胞总数中凋亡细胞的比例(平均值 ± SEM, $n = 3$)。用 ANOVA 进行统计分析之后进行 Student-New-Man-Keuls 检验。不同数值代表统计的显著性不同($P < 0.05$)

GC的增殖需要OC分泌的GDF-9和BMP-15。这些因子在OC的表达改变,将显著影响卵泡成熟和卵巢功能。

GDF-9是OC分泌的惟一能增加原始和初级卵泡数量的因子。缺乏Gdf-9,GC的kit配基表达增加,GC发育不正常,导致OC早熟、凋亡。Gdf-9突变的小鼠,除初级卵泡外,其余卵泡的OC因膜标志物缺失,发生凋亡,卵泡生长受阻。GDF-9通过诱导透明质酸合成酶2,TNF诱导因子6的表达,抑制尿激酶活性,促进卵丘卵母细胞复合体(COC)的形成,调节卵丘的扩张,对有效排卵是必不可少的^[7]。从大鼠小窦状和排卵前卵泡分离GC进行体外培养,发现GDF-9能促进GC增殖,但抑制其分化,抑制FSH诱导的cAMP的产生,进而抑制GC产生雌激素和孕酮^[8]。

BMP-15能显著抑制FSHR mRNA的表达,从而

使受FSH诱导的StAR,P450副链剪切酶(P450scc)、P450arom表达减少,BMP-15的作用可能是通过Smad1/5/8通路完成的^[9]。另外,BMP-15能促进GC有丝分裂,表达KL,反之,KL通过OC表面的c-kit,抑制BMP-15的表达,从而形成负反馈调节环。BMP-15和KL通过OC和GC间的对话调节GC的有丝分裂^[10]。

Bmp-15/Gdf-9点突变的杂合子动物排卵率增加;而完全突变的动物卵泡发育缺陷,不能生育。BMP-15在功能上与GDF-9协同维持COC的完整性,使雌性小鼠具有最大程度的受精能力。对Gdf9^{+/-}Bmp15^{-/-}双突变小鼠进行研究,观察到卵丘扩增、OC成熟、受精和植入前的胚胎发生等方面均有异常^[11]。因为GDF9和BMP15受体主要在GC中表达,在小鼠OC中还未发现,所以Gdf9和Bmp15突变首先是

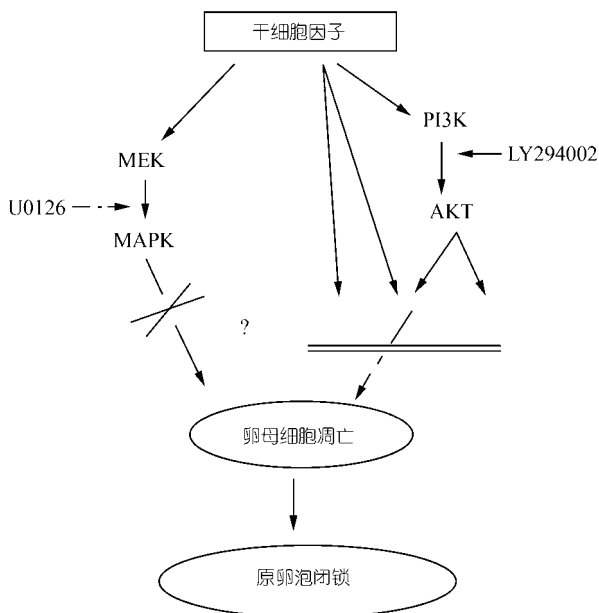


图2 SCF抗凋亡信号通路的假想示意图(引自金莹等人^[4])
凋亡诱导的原始卵泡闭锁(primordial follicle atresia)可能来源于卵母细胞。已经证明, PI3K/AKT 通路对卵母细胞中 SCF 的抗凋亡作用是重要的, SCF 引起抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的增加, 减少凋亡前蛋白 Bax。然而, MEK/MAPK 通路不转导卵母细胞中 SCF 的抗凋亡作用, 可能是通过另外的通路。实线箭头表示刺激, 虚线箭头表示抑制

通过影响 GC, 然后影响 OC。

2 颗粒细胞的增殖分化及信号通路

GC增殖分化是卵泡发育的重要环节。原始卵泡启动生长后, GC随着生长分化出FSHR。我们以增殖细胞核抗原(PCNA)为GC增殖的检测指标, 以StAR和甾类激素生成为GC分化指标, 观察了FSH对GC增殖分化的作用^[12]。

FSH通过激活GC上FSHR偶联的G蛋白, 激活激素敏感的腺苷酸环化酶, 引起细胞内的cAMP升高, 进而激活下游的PKA信号通路。另外, H89(PKA抑制剂)、U0126(MEK1/2 抑制剂)、SB203580(p38MAPK抑制剂)或PMA(PKC激活剂)可明显改变FSH对甾体生成的诱导作用, 表明有多条信号通路参与GC甾体生成的调控(图3)^[13]。

我们研究了FSH诱导离体培养大鼠GC增殖和分化的信号通路。FSH处理GC, 可迅速激活p38MAPK激酶, 处理 5 min便可观察到磷酸化的p38MAPK; H89 则显著抑制FSH对p38MAPK的激活作用, 提示这种激活依赖PKA。RT-PCR显示, 抑制p38MAPK活性可促进FSH对StAR的刺激作用, 而抑制FSH对

P450arom mRNA的促进作用。研究还证实, FSH可显著提高GC中肝受体同源物-1(LRH-1)蛋白表达水平; 阻断p38MAPK通路后, 此作用受到显著抑制, 同时发现FSH促GC转录因子X染色体基因-1(DAX-1)表达的作用也受抑制^[13]。

ERK1/2 通路在FSH诱导PCNA表达和甾体生成中也起重要作用。FSH能快速激活体外培养GC中的ERK1/2 磷酸激酶。抑制PKA的活性, 则FSH和forskolin对ERK1/2 磷酸激酶的激活作用显著降低, 表明这种激活作用可能依赖cAMP和PKA。用U0126抑制ERK1/2 活性则明显降低FSH对PCNA, StAR和甾体生成的诱导作用^[12]。

最近, 许多细胞模型研究表明, PI-3K通路在调节细胞周期中起主要作用。在无血清培养条件下, FSH作用能引起GC分化, 但不能促进其增殖, 只有在加入activin或GDF-9 的情况下, GC才会增殖^[14]。Park等人^[15]进一步研究了FSH和Activin对大鼠GC增殖的影响, 结果表明, FSH和Activin促进GC的增殖是通过激活PI-3K和Smad2/3 通路, 从而作用于转录因子FOXO1, 解除其对Cyclin D2 启动子的抑制, 使细胞周期进行下去。

LH对GC和OC的信号通路同样起重要作用。排卵前LH峰的出现促进GC基因表达的变化, 促进卵丘的扩张和OC减数分裂的重新启动。研究表明, MAPK通路在此过程中发挥重要作用。抑制MAPK的激活能阻止卵丘扩张两个相关基因Has2 和Ptgs2 的表达和OC减数分裂的完成^[16]。CC上有LHR, 受到LH刺激后, 可快速激活MAPK。用U0126 阻断MAPK, 缝隙连接蛋白Cx43 将不再对LH有反应, 不出现两种磷酸化形式。总之, MAPK可能是通过Cx43 的磷酸化, 切断细胞间对话, 调节LH诱导的OC成熟^[17]。

3 颗粒细胞分泌因子对卵泡发育的调节

GC合成许多活性肽, 如抑制素(inhibin)、激活素(activin)和卵泡抑素(follistatin), inhibin和activin属于TGF β s家族, 是二聚化的蛋白。inhibin是一个 α , β -异源二聚子, 而activin是 β , β -同源二聚子。这些蛋白除了参与调节垂体释放FSH外, 也可作为卵泡发育的局部调节因子发挥作用。inhibin负反馈调节FSH的合成/分泌, 对人颗粒/黄体细胞类固醇的产生没有作用, 但它可诱导TC合成雄激素。inhibin通过自分泌/旁分泌作用, 抑制GC产生雌二醇^[18]。优势卵泡产生

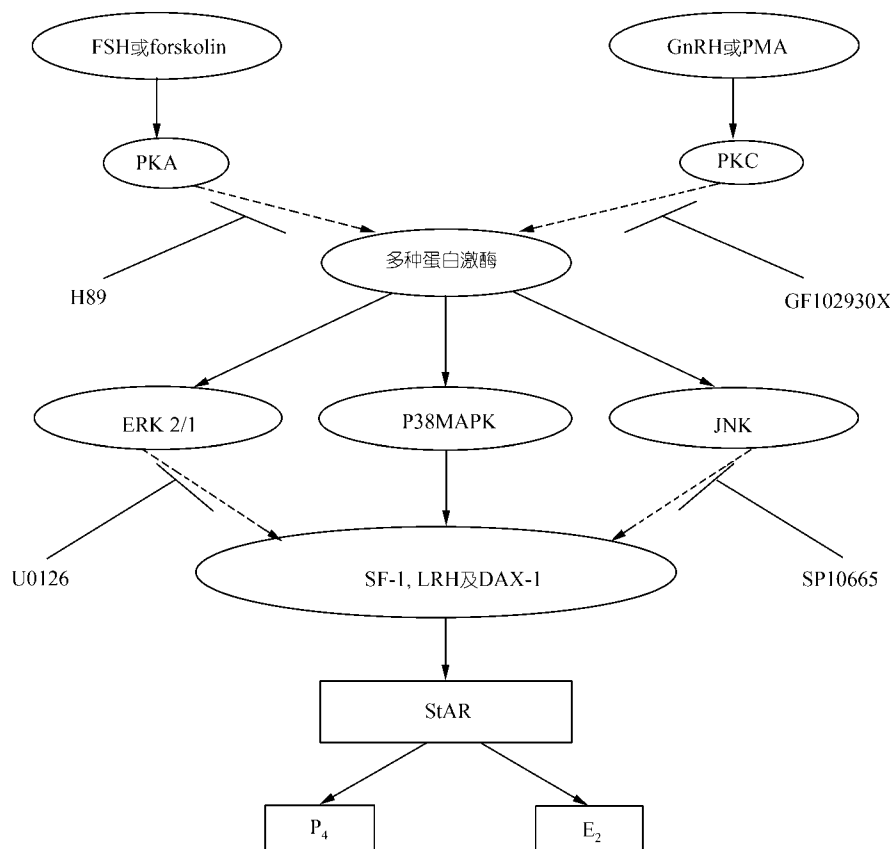


图3 颗粒细胞合成类固醇的信号通路(引自于福清等人^[13])

FSH 或 Forskolin(通过 PKA 通路)和 GnRH 或 PMA(通过 PKC 通路)增加细胞内 StAR 的表达, 颗粒细胞合成类固醇, 雌激素(E)和孕酮(P4), StAR 是合成类固醇的限速蛋白, 受许多转录因子, 如 SF-1, AP-1, DAX-1 和孤儿受体 LRH 的调节

的inhibin, 可作为一种旁分泌因子, 抑制临近卵泡的生长, 所以inhibin参与优势卵泡的选择机制^[19]. activin能促进发育中的GC增殖, 在activin, 而不是inhibin存在时, FSH刺激从未成熟大鼠卵巢分离的GC的颗粒细胞的DNA合成^[20]. activin也增加体外培养的人颗粒/黄体细胞增殖, 抑制其合成孕酮和雌激素^[21]. follistatin具有抑制FSH活性的作用, 后来发现, follistatin通过和inhibin及activin共有的 β 亚单位结合, 中和activin的生物活性^[22].

IGF-1 能促进GC增殖及类固醇产生. IGF结合蛋白(IGFBP)的合成和水解受FSH控制, 调节卵泡内IGF-1的活性和GC对FSH的敏感性. IGF-1可能在卵泡闭锁过程中抑制GC的凋亡^[23].

AMH 是 TGF- β 的一个家族成员, 在 GC 中表达, 尤其是在增殖较快的初级和次级卵泡GC中表达. 在体外培养的腔前卵泡, AMH能增强FSH的作用, 诱导卵泡直径增大和细胞数量增加. 然而, 在雌性转基因

小鼠卵巢中过表达AMH会引起早期卵巢退化. 另有研究发现, 在卵泡发育早期阶段, AMH能抑制原始卵泡的生长启动^[24].

4 颗粒细胞凋亡和卵泡闭锁

在哺乳动物卵巢中只有少部分卵泡排卵, 99%的卵泡发生闭锁. 卵泡闭锁除形态上的变化外, 还有一些生化指标, 如GC DNA合成下降, Cx43 表达抑制, 芳香化酶、促性腺激素受体mRNA的表达降低以及雌激素合成下降, 孕激素合成增加. 此外, 有一些基因表达增加, 如IGFBPs, 硫酸盐糖蛋白-2(TRPM-2)等. 卵泡闭锁从形态上分为两类: 起源于GC的凋亡, 起始于卵母细胞的凋亡. 我们研究发现, 卵泡OC中组织型纤溶酶原激活因子(tPA)蛋白活性的提前表达将引发OC凋亡^[6].

卵泡的选择主要依赖GC的凋亡. 缝隙连接交流和缝隙连接蛋白Cx43 的表达与GC的存活和凋亡有

关。Cx43 的表达与凋亡指数呈负相关,表明Cx43 在GC存活中起作用,而缝隙连接在传递细胞死亡信号中起作用^[25]。促性腺激素/cAMP信号在卵泡形成过程中可以作为GC的存活因子,IGF-1 能提高促性腺激素对卵泡分化的刺激作用。利用大鼠排卵前卵泡体外培养模型证明,hCG能提高培养卵巢中IGF-1 mRNA的水平,hCG对卵泡凋亡的抑制作用可被IGFBP-3阻断。这些结果表明,IGF-1 也是卵泡细胞的存活因子,促性腺激素对凋亡的抑制作用可能部分是通过诱导卵巢IGF-1 生成而实现的。但IGF-1 和Insulin都不能抑制体外培养的GC凋亡^[26]。

有证据表明,孕酮可以通过PKG依赖的通路抑制大鼠GC的凋亡^[27]。通过用孕酮受体的抗体C-262进行亲和层析分离得到一种分子量 60 kD的蛋白,可以通过调节ERK的活性,抑制GC凋亡,将其测序并命名为RDA288。免疫组化结果显示,它定位于有腔卵泡的GC的胞浆和浆膜部分,有几个透明质酸结合位点,在孕酮的抗GC凋亡中起重要作用^[28,29]。

另外,EGF和TGF- α 能直接诱导体外培养的GC中ERK1/2 的磷酸化,EGF和TGF- α 撤除后,MAPK信号丢失,同时GC发生凋亡。有证据表明,酪氨酸激酶抑制剂可以完全阻断EGF/TGF- α 的凋亡抑制作用^[30]。

虽然活性 PKC 因子支持 GC 生存及其作用机制的研究资料还不多,已有研究证明,纤维生长因子(FGF)能减弱或阻止体外培养的大鼠 GC 凋亡,其作用与 PKC 亚类 δ 活性有关。但与 PKA 和 PKB 不同,PKC 活性并不是维持细胞生存所必需的,因为 PKC 活性抑制剂并不能有效地促进培养的 GC 凋亡。

目前,在猪GC中发现了 5 种细胞死亡配体和受体系统:TNF- α 及受体、Fas(也称为APO-1/CD95)配基和受体、TNF相关的诱导凋亡的配基(TRAIL,也称为APO-2)及受体、APO-3 配基和受体及PFG-5 配基和受体。猪GC是一个II型凋亡细胞,依赖线粒体的凋亡信号通路。最近发现的两种细胞内抑制蛋白(细胞的FLICE样抑制蛋白,短形式的cFLIPs和长形式的cFLIPL)在GC高表达,可能作为抗凋亡因子而发挥作用^[31]。

bcl-2 基因家族, bax, Fas/FasL 系统及 p53 和 XIAP(X-相连的凋亡抑制子)参与 GC 的凋亡,且受促性腺激素的调节。体内和体外实验证明, XIAP 在大鼠 GC 中表达,受 FSH 和马绒毛膜促性腺激素(cCG)的调节,PI-3K/AKT 参与 XIAP 对 GC 凋亡的抑制。

survivin是凋亡抑制蛋白(IAP)家族中一个含有独特结构的分子,它在GC中作为一个双功能蛋白可以调节细胞周期和抑制细胞凋亡。在发育卵泡中,分裂活跃的GC含较高水平的survivin mRNA,分析细胞周期发现,其在G2/M期表达增加。瞬时转染survivin能减弱caspase-3 活性^[32]。

在卵泡闭锁过程中,GC 首先凋亡,TC 随后也表现出广泛的凋亡。有许多抗凋亡因子在 TC 中表达,包括 Bcl-2, Bcl-xL 和 Mcl-1,以及 IAP 家族蛋白 cIAP-1, XIAP 和 survivin。TC 存活的机制及其调控以及 TC 与 GC 在早期卵泡闭锁的信号通路研究很少。

5 卵泡细胞间的相互作用

OC 和 GC, GC 和 GC, GC 和 TC 之间的对话对于卵泡发育、OC 的成熟起重要作用,受到人们的关注。这种相互作用的结构基础主要是细胞之间的连接。缝隙连接蛋白主要由 connexin(Cx)组成,是一个膜蛋白家族。其中Cx43 和 Cx37 在卵巢的卵泡发生中起重要作用。Cx37 定位在 GC 和 OC 间的缝隙连接,而Cx43 主要定位在周围的 GC 之间。靶向缺失 Cx43,卵泡发育在早期停止,OC 不能完成减数分裂;靶向缺失 Cx37 基因,影响卵泡的后期发育,阻止成熟卵泡的形成,引起成熟前黄体化,且 OC 不能完成减数分裂。所以说两细胞间的缝隙连接对于二者的交叉对话起重要作用。

另外,某些细胞分泌因子与其受体在不同细胞中的表达,或不同细胞表达的因子间的相互作用,形成了细胞间相互作用的物质基础,如前述的GDF-9, BMP-15, KL等。PCNA染色发现,缺失Cx43 的卵巢中,GC的DNA合成减少,用重组的GDF-9 能使连接缺陷的GC的增殖恢复到对照细胞的水平。缺失Cx43 的小鼠卵泡发育缺陷,部分地是由于GC对GDF-9 的反应减少所致,表明了两种细胞间对话模式存在交互作用^[33]。我们早期的研究发现,GC分泌一种未知因子,在离体下能刺激OC中组织型纤溶酶原激活因子(tPA)的活性^[34]。

我们用 DNA 3'末端标记、免疫组化和原位杂交的方法,通过连续切片比较了同一卵泡 GC inhibin, LHR 表达和 OC tPA 表达与卵泡闭锁的关系。从初级卵泡的OC开始就表达 tPA mRNA,但不能翻译成 tPA 蛋白,并证明 GC 表达高水平的 inhibin 可抑制 OC 中的 tPA mRNA 翻译成 tPA 蛋白,是 tPA mRNA 翻译

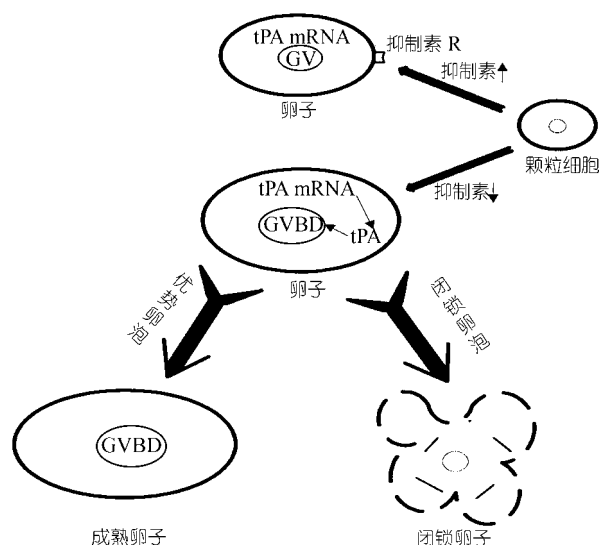


图4 GC释放的inhibin对卵母细胞中tPA mRNA翻译的影响(引自严军丽等人^[6,35])

GCs来源的inhibin通过抑制OC中tPA mRNA的翻译抑制OC的成熟。一旦GCs中inhibin表达减少,OC中tPA mRNA开始翻译成活性蛋白,增加的tPA活性诱导优势卵泡的OC发生GVBD,OC成熟并排卵。另一方面,发育卵泡GC中的inhibin表达减少,卵母细胞的tPA mRNA翻译成tPA蛋白,能够诱导发育卵泡中发生类似于GVBD的形态学改变,此后导致卵母细胞和/或卵泡的闭锁。

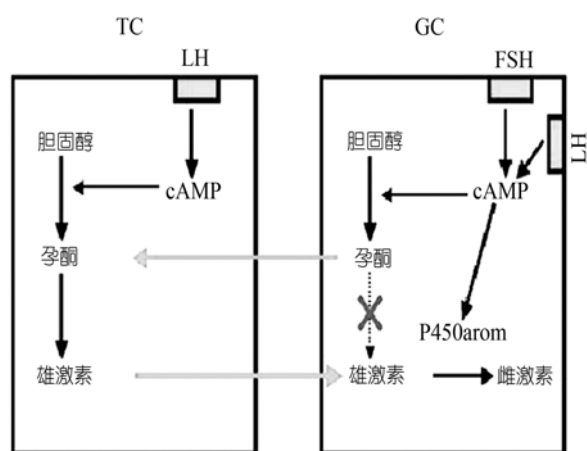


图5 颗粒细胞和膜细胞相互作用参与卵泡中雌激素的产生的代表图(引自刘以训等人^[36])

在LH的调节下,TC合成雄激素,但因为TC中缺少P450arom不能转变成雌激素,而GC在FSH(末期也受LH作用)的作用下合成孕酮,后者因为在GC中缺乏必要的转换酶,不能进一步转化成雄激素。尽管GC有P450arom,但它本身不能合成雌激素。TC可以利用GC产生的孕酮转变成雄激素,而GC能利用TC产生的雄激素将其转变成雌激素。TC和GC在卵泡中的相互作用对卵巢中雌激素的生物合成是先决条件

一种抑制因子,如GC中inhibin表达下降,则OC中tPA

蛋白活性增加,并引起卵泡闭锁。我们提出了源于卵细胞凋亡,诱发卵泡闭锁的分子机制(图4)^[6,35]。

卵泡GC和TC的相互作用是卵泡发育和维持正常功能的重要条件。研究表明,GC产生的孕酮可被TC利用转化为雄激素,而TC产生的雄激素又可被GC芳香化酶作用转化为雌激素。因此,GC和TC的相互作用是卵巢雌激素形成的前提(图5)^[36]。

卵巢GC和TC的相互作用也是卵泡破裂引起排卵的原因。研究表明,GC主要表达纤溶酶原激活因子(tPA),而TC主要产生tPA的抑制因子PAI-1(血浆纤溶酶原抑制因子-1)。在激素调控下,GC表达的激活因子tPA和TC产生的抑制因子PAI-1在卵泡不同细胞中的协同表达,在卵泡内可导致定向局限蛋白水解流的形成,诱发卵泡局部定向破裂,引起排卵^[37,38]。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:90208025,30370200,30270196)和中国科学院知识创新(批准号:KSCX-SW-201)资助项目。

参 考 文 献

- Jin X, Han C S, Zhang X S, et al. Signal transduction of stem cell factor in promoting early follicle development. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 229: 3~10 [DOI]
- Matzuk M M, Burns K H, Viveiros M M, et al. Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science*, 2002, 296: 2178~2180 [DOI]
- Jeff A P, Michael K S. Kit-ligand/Stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, 1999, 140: 4262~4271 [DOI]
- Jin X, Han C S, Yu F Q, et al. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Mol Reprod Dev*, 2005, 70: 82~90 [DOI]
- Jin X, Han C S, Zhang X S, et al. Stem cell factor modulates the expression of steroidogenesis related proteins and FSHR during ovarian follicular development. *Front Biosci*, 2005, 10: 1573~1580
- 金萱, 刘以训. 卵泡生长、分化和闭锁的调控. *科学通报*, 2003, 48(14): 1506~1510
- Varani S, Elvin J A, Yan C, et al. Knockout of prntraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol Endocrinol*, 2002, 16: 1154~1167 [DOI]
- Vitt U A, Hayashi M, Klein C, et al. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod*, 2000, 62: 370~377 [DOI]
- Moore R K, Otsuka F, Shimasaki S. Molecular basis of Bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem*, 2003, 278: 304~310 [DOI]
- Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand:

- Its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 8060~8065 [DOI]
- 11 Su Y Q, Wu X, O'Brien M J, et al. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Dev Biol*, 2004, 276: 64~73 [DOI]
- 12 Yu F Q, Han C S, Yang W, et al. Role of erk1/2 in fsh-induced pcna expression and steroidogenesis in granulosa cells. *Front Biosci*, 2005, 10: 896~904
- 13 Yu F Q, Han C S, Yang W, et al. Activation of p38 MAPK pathway by FSH regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially. *J Endocrinol*, 2005, 186: 85~96 [DOI]
- 14 Roh J S, Bondestam J, Mazerbourg S, et al. Growth differentiation factor-9 stimulates inhibin production and activates smad2 in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 2003, 144: 172~178 [DOI]
- 15 Park Y, Maizels E T, Feiger Z J, et al. Induction of cyclin D2 in rat granulosa cells requires FSH-dependent relief from FOXO1 repression coupled with positive signals from Smad. *J Biol Chem*, 2005, 280: 9135~9148 [DOI]
- 16 Su Y Q, Denegre J M, Wigglesworth K, et al. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase(ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Dev Biol*, 2003, 263: 126~138 [DOI]
- 17 Sela-Abramovich S, Chorev E, Galiani D, et al. MAPK mediates LH-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology*, 2005, 146: 1236~1244 [DOI]
- 18 Jimenez-Krassel F, Winn M E, Burns D, et al. Evidence for a negative intrafollicular role for inhibin in regulation of estradiol production by granulosa cells. *Endocrinology*, 2003, 144: 1876~1886 [DOI]
- 19 Wang H B, Xie H R, Xia G L. Inhibin and activin in the mammalian ovary. *J Agric Biotechnol*, 2002, 10: 197~202
- 20 Miro F, Smyth C D, Whitelaw P F, et al. Regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase5/4-isomerase and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 by activin in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 1995, 136: 3247~3252 [DOI]
- 21 Rabinovici J, Spencer S J, Doldi N, et al. Activin-A as an intraovarian modulator: action, localization, and regulation of the intact dimer in human ovarian cells. *J Clin Invest*, 1992, 89: 1528~1536
- 22 Amsterdam A, Selvaraj N. Control of Differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endocrine Rev*, 1997, 18: 435~461 [DOI]
- 23 Yu Y S, Sui H S, Han Z B, et al. Apoptosis in Granulosa cells during follicular atresia: Relationship with steroids and insulin-like growth factors. *Cell Res*, 2004, 14: 341~346
- 24 Durlinger A L, Gruijters M J, Kramer P, et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 2002, 143: 1076~1084 [DOI]
- 25 Dmitri V, Krysko S M, Luc L, et al. Gap Junctional communication and connexin43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells. *Endocrinology*, 2004, 52: 1199~1207
- 26 Chun S Y, Billig H, Tilly J L, et al. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: Mediatary role of endogenous insulin-like growth factor. *Endocrinology*, 1994, 135: 1845~1853 [DOI]
- 27 Peluso J J, Pappalardo A. Progesterone regulates granulosa cell viability through a protein kinase g-dependent mechanism that may involve 14-3-3{sigma}. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1870~1878 [DOI]
- 28 Peluso J J. Rapid actions of progesterone on granulosa cells. *Steroids*, 2004, 69: 579~583 [DOI]
- 29 Peluso J J, Pappalardo A, Fernandez G, et al. Involvement of an unnamed protein, RDA288, in the mechanism through which progesterone mediates its antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells. *Endocrinology*, 2004, 145: 3014~3022 [DOI]
- 30 Tilly J L, Billig H, Kowalski K I, et al. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol*, 1992, 6: 1942~1950 [DOI]
- 31 Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, et al. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: Regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Dev*, 2004, 50: 493~514 [DOI]
- 32 Johnson A L, Langer J S, Bridgham J T. Survivin as a cell cycle-related and antiapoptotic protein in granulosa cells. *Endocrinology*, 2002, 143: 3405~3413 [DOI]
- 33 Gittens J E, Barr K J, Vanderrhyden B C, et al. Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *J Cell Sci*, 2005, 118: 113~122 [DOI]
- 34 Liu Y X. A factor(s) produced by rat granulosa cells stimulated oocyte tissue plasminogen activator activities *in vitro*. *Scientia Sinica B*, 1989, 32: 42~49
- 35 严军丽, 冯强, 柳海珍,等. 卵泡闭锁与其tPA, LH 受体及抑制素 α , β_A 亚基因表达的关系. *中国科学, C辑*, 1999, 29: 592~599
- 36 Liu Y X, Hsueh A J. Synergism between granulosa and theca-interstitial cells in estrogen biosynthesis by gonadotropin-treated rat ovaries: Studies on the two-cell, two-gonadotropin hypothesis using steroid antisera. *Biol Reprod*, 1986, 35: 27~36 [DOI]
- 37 Liu Y X, Liu K, Feng Q, et al. Coordination expression of tissue-type plasminogen activator and its inhibitor plasminogen activator inhibitor type 1 plays an important role in ovulation in the rhesus monkey. *Endocrinology*, 2004, 145: 1767~1775 [DOI]
- 38 Liu Y X. Plasminogen activator/plasminogen activator inhibitors in ovarian physiology. *Front Biosci*, 2004, 9: 3356~3373

(2005-06-21 收稿, 2005-09-26 收修改稿)