

可卡因-苯丙胺调控转录肽(CART)对猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素产生的影响

李鹏飞¹, 岳文斌², 李富禄², 黄洋², 孙晋艳², 朱芷薇²,
于秀菊², 贺俊平², 范瑞文², 任有蛇², 吕丽华^{2*}

(1. 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801; 2. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘要: 旨在研究可卡因-苯丙胺调控转录肽(Cocaine amphetamine regulated transcript, CART)对促卵泡素(Follicular stimulating hormone, FSH)诱导的猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素产生的影响。用 Long-term 培养方法在不同 CART、FSH 浓度下对猪卵巢卵泡颗粒细胞培养 7 d, 在显微镜下观察各孔细胞生长情况并采集图像; 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定各孔雌激素浓度。细胞培养 168 h 后: (1) 在培养液不添加 CART 时, 添加 FSH 孔中的雌激素浓度与不添加孔相比, 显著提高; 浓度为 25 ng · mL⁻¹ 时, 雌激素浓度最高, 为 (17 295.57 ± 184.03) pg · mL⁻¹; (2) CART 对体外培养的无 FSH 和 FSH 为 5 ng · mL⁻¹ 的猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的产生没有影响; (3) 当培养体系 FSH 浓度分别为 25 和 50 ng · mL⁻¹ 时, 随着 CART 浓度的升高 (0.01、0.1、1 μmol · L⁻¹), 培养液雌激素浓度有下降的趋势, 但各组间差异不显著 ($P > 0.05$)。但是, 当 FSH 为 25 ng · mL⁻¹, CART 为 0.1 和 1 μmol · L⁻¹ 时, 与对照组相比, 颗粒细胞雌激素的产生明显受到抑制 ($P < 0.05$)。但是, 统计分析 FSH 和 CART 互作效应并不显著 ($P > 0.05$), 这一点需进一步试验证明; (4) 当培养液添加 50 ng · mL⁻¹ FSH 时, 随着 CART 浓度的升高 (0.01、0.1、1 μmol · L⁻¹), 与对照组相比, 雌激素浓度各组差异不显著 ($P > 0.05$)。猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的产生需在 FSH 诱导下进行; 当培养液 FSH 为 25 和 50 ng · mL⁻¹ 时, CART 对 FSH 诱导的猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的产生有抑制作用, 但抑制效果并不显著。由此推断, 并不像单胎的牛、羊, CART 在猪卵泡发育过程中, 可能并非是个主要的局部负调控因子。

关键词: 猪; 可卡因-苯丙胺调控转录肽; 促卵泡素; 雌激素; 颗粒细胞; 体外培养

中图分类号: S828; S814.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)12-1879-08

Effects of CART on Estradiol Production of Pig Ovarian Follicular Granulosa Cells *in vitro* Culture

LI Peng-fei¹, YUE Wen-bin², LI Fu-lu², HUANG Yang², SUN Jin-yan², ZHU Zhi-wei²,
YU Xiu-ju², HE Jun-ping², FAN Rui-wen², REN You-she², LV Li-hua^{2*}

(1. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The study focused on the effect of CART on FSH-induced estradiol production of porcine ovarian follicular granulosa cells. Granulosa cells were cultured for 7 days under different CART and FSH concentrations by Long-term culture. The growth situation in each well was observed and pictures were taken. The content of estradiol in each well was determined by sandwich ABC-ELISA. After 168 h of incubation, (1) In CART-free medium, the estradiol levels in wells supplemented with FSH significantly increased than that of FSH-free well. Adding of 25 ng · mL⁻¹ of FSH

收稿日期: 2012-03-29

基金项目: 国家自然科学基金(31172211); 农业部 948 项目(2010-Z43); 山西省留学基金和山西省引进人才专项基金项目(2008080); 山西省国际科技合作项目(2010081002)

作者简介: 李鹏飞(1978-), 男, 山西偏关人, 讲师, 博士生, 主要从事动物生殖生理方面的研究, E-mail: adampf@126.com

* 通讯作者: 吕丽华, 教授, 博导, E-mail: sxaulh@yahoo.com.cn

resulted in the highest estradiol level of $(17\ 295.57 \pm 184.03) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$; (2) CART showed no effect on estradiol production by porcine ovarian follicular granulosa cells cultured in FSH-free and $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ FSH medium; (3) In the medium containing 5 or $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ FSH, with the increase of CART concentration ($0.01, 0.1, 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), the levels of estradiol concentration showed a tendency to decrease but there was no significant differences among the three groups ($P > 0.05$). However, when FSH at $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, CART at 0.1 or $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, compared with the control group (FSH $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, CART $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), estradiol secreted by follicular granulosa cells was suppressed markedly ($P < 0.05$). The result of statistical analysis demonstrated no significant interactive effect between FSH and CART ($P > 0.05$), which needs further investigation. (4) When the medium contained $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ of FSH, the increase of CART concentration showed no significant influence on estradiol concentration in different groups ($P > 0.05$). The production of follicular estradiol in pig was induced by FSH; when the concentration of FSH were 25 and $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, CART inhibited the estradiol production by porcine follicular granulosa cells, but no significant inhibitory effects. The result indicate that CART maybe not a main local negative regulatory factor in pig follicular development.

Key words: pig; CART; FSH; estradiol; granulosa cell; *in vitro* culture

Sen 等研究证明, CART 在牛卵泡颗粒细胞上有表达, 并通过研究证明 CART 在某一 FSH 浓度下, 对体外培养的卵泡颗粒细胞生长有着显著影响^[1]。本课题组通过前期研究已经证明, CART mRNA 同样在猪的卵泡颗粒细胞中有表达^[2], 但 CART 对猪卵泡颗粒细胞的生长具体有什么样的作用尚未知晓。

本试验正是以此为研究目的, 利用 Long-term 细胞培养方法对猪卵巢卵泡颗粒细胞进行体外培养后, 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法对培养液中雌激素浓度的准确测定, 是研究 CART 和 FSH 对猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素分泌的交互作用和调控特点的关键, 为进一步研究 CART 对猪繁殖机能的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选取太谷县屠宰场雌性大白猪作为研究对象, 动物宰杀后采集卵巢。

CART (购于 American Peptid Company, INC)、FSH (购于 American Invitrogen)、MEM 培养液、两性霉素 (Fungizone)、非必需氨基酸、转铁蛋白、胰岛素、雄激素、IGF、胰蛋白酶 (Trypsin)、氨苄青霉素、链霉素、台盼蓝、雌二醇放射免疫测定试剂盒、EDTA 等购自上海生物工程公司。Na₂HPO₄、KH₂PO₄、NaCl、KCl、NaHCO₃、亚硒酸钠、三氯甲

烷、异丙醇、酵母提取物等购于天津化学试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 颗粒细胞体外培养所用试验器具的处理

对于玻璃器皿、胶塞和塑料制品, 必须经严格的酸碱程序处理后, 最后用自来水和双蒸水各冲洗 3 次, 烘干后待用。

1.2.2 颗粒细胞的收集 将收集到的卵巢用眼科剪将卵泡从中间剪开, 再用刮刀轻轻刮取卵泡内的颗粒细胞, 使颗粒细胞流入培养皿的培养液中, 然后用胶头滴管吸至离心管中。收集到颗粒细胞后, 加入适量培养液使颗粒细胞悬浮, 此悬浮细胞即为试验用颗粒细胞。

1.2.3 颗粒细胞的体外培养 采用 Long-term 培养方法^[3-4], $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$, 饱和湿度条件下, 在 MEM- α 培养液里培养颗粒细胞 7 d, 每 48 h 换液 1 次, 培养第 7 天用 DPBS (Dulbecco PBS) 胰蛋白酶消化^[5], 并细胞计数。分别在培养 48、96、144 h 后, 在显微镜下观察各孔细胞生长情况并采集图像; 培养 168 h 后, 在显微镜下观察各孔细胞生长情况并采集图像, 以相邻 2 孔为单位, 每孔抽取 $170 \mu\text{L}$ 细胞培养液放入离心管并迅速转入 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中冻存, 待测激素。

1.2.4 雌激素测定 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法, 选用雌二醇放射免疫测定试剂盒进行测定。

1.2.5 雌激素浓度计算 以标准品 8 000、

4 000、2 000、1 000、500、250、125、0 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为横坐标,OD 值为纵坐标,在坐标纸上作图,画出标准曲线;根据样品 OD 值在该曲线图上查出相应雌激素含量,再乘以稀释倍数即得雌激素浓度。

1.2.6 数据处理与分析 结果用 3 次重复试验的“平均值±标准误”表示,采用 Excel 2003 作图,用 DPS 6.5(Data Processing System 6.5)对各指标进行线性相关分析。

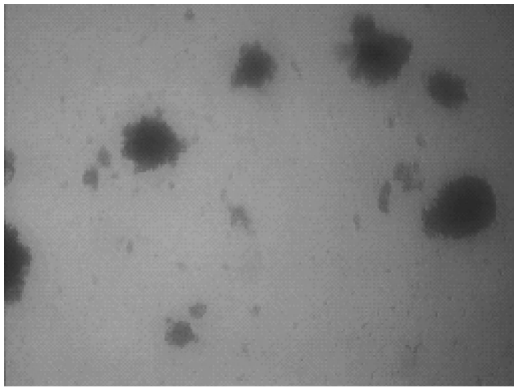
2 结 果

2.1 猪卵巢卵泡颗粒细胞体外培养图像采集结果

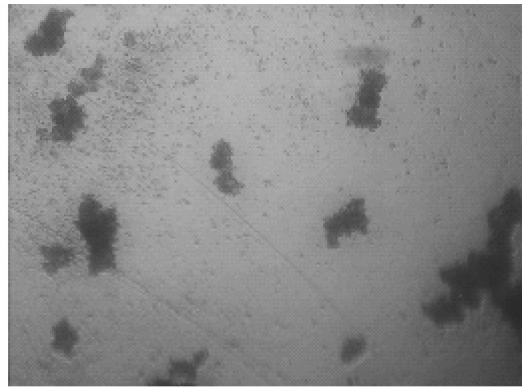
猪卵巢卵泡颗粒细胞体外培养 168 h 后,对颗

粒细胞生长情况的图像采集显示,当 FSH 浓度为 0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,随着 CART 浓度的逐渐增大,卵巢卵泡颗粒细胞的密度变化不明显,同时难以形成成串的细胞群。表明在不添加 FSH 的情况下,CART 对猪卵巢卵泡颗粒细胞的增殖没有明显作用(图 1)。

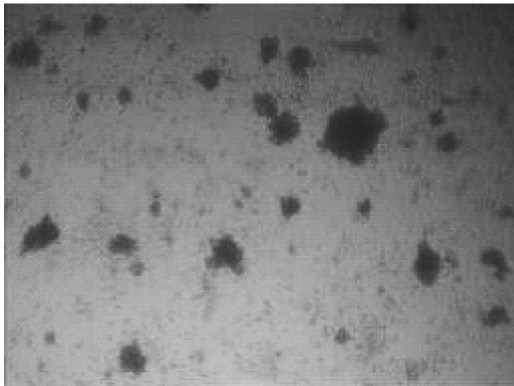
当 CART 的浓度为 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着 FSH 浓度的逐渐加大,卵巢卵泡颗粒细胞的密度也逐渐增大;当 FSH 浓度为 25 和 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,颗粒细胞大量聚集形成成串的细胞群。表明 FSH 对猪卵巢卵泡颗粒细胞的增殖有促进作用,但这 2 组的细胞增殖情况相似(图 2)。



FSH: 0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, CART: 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$



FSH: 0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, CART: 0.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$



FSH: 0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, CART: 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$



FSH: 0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, CART: 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 1 不同 CART 浓度下体外培养 168 h 猪卵巢颗粒细胞的生长情况(100×)

Fig. 1 The growth of pig ovarian granulosa cells in different CART concentrations after 168 h *in vitro* culture(100×)

当 FSH 为 25 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, CART 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 卵巢卵泡颗粒细胞的增殖被抑制(图 3),因此推断,在该浓度条件下,CART 对 FSH 诱导的猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的分泌有明显的抑制作用,但还需激素测定分析后加以证实。

2.2 猪卵巢卵泡颗粒细胞体外培养 168 h 后雌激素水平测定结果

经 DPS 6.5 单变量线性模型分析,FSH 主效应为极显著($P < 0.01$)、CART 主效应显著($P < 0.05$)、FSH 和 CART 互作效应不显著($P > 0.05$),说明 FSH 和 CART 之间没有交互作用(表 1)。

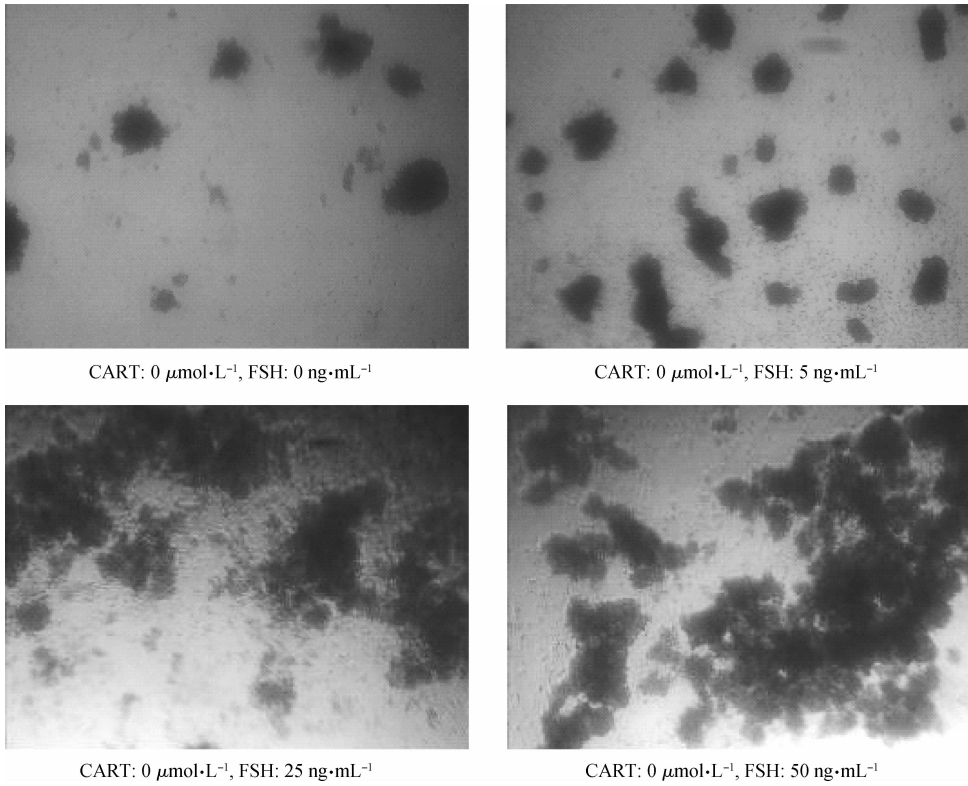


图 2 不同 FSH 浓度下体外培养 168 h 猪卵泡颗粒细胞的生长情况 (100×)

Fig. 2 The growth of pig ovarian granulosa cells in different FSH concentrations after 168 h *in vitro* culture (100×)

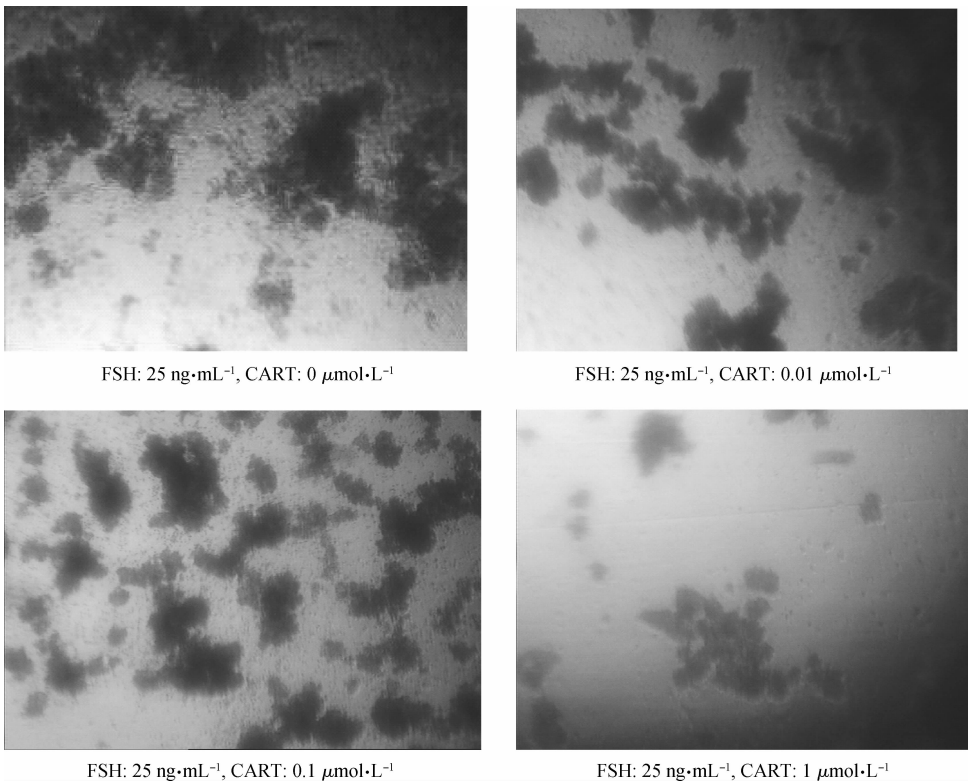


图 3 FSH 浓度为 $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时不同 CART 浓度下体外培养 168 h 猪卵巢卵泡颗粒细胞的生长情况 (100×)

Fig. 3 The growth of pig ovarian granulosa cells in different CART concentrations with FSH $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ after 168 h *in vitro* culture (100×)

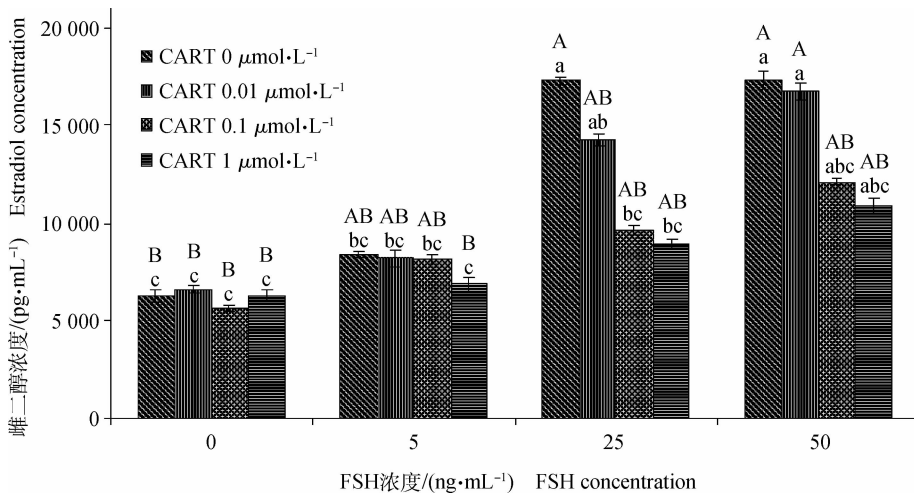
表 1 CART、FSH 主体间效应的检验

Table 1 Test of intersubjective effect

变异来源 Source of variability	平方和 Square	自由度 df	均方 Mean square	F	P
FSH	460 330 766.192 2	3	153 443 588.730 7	12.064 0	0.000 1
CART	115 932 970.275 7	3	38 644 323.425 2	3.038 0	0.046 9
FSH * CART	86 519 929.470 2	9	9 613 325.496 7	0.756 0	0.656 4
误差 Error	330 708 710.659 0	26	12 719 565.794 6		
总变异 Total variation	993 492 376.597 1	41			

显著性检验(图 4)表明,与对照组(CART、FSH 均为 0)相比,培养液加入不同浓度 FSH(5、25、50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$),雌激素浓度显著提高;当 FSH 浓度为 25 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,培养液雌激素浓度最高(17 295.57 \pm 184.03) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的产生需在 FSH 诱导下进行;CART 对体外培养的基础(无 FSH)和 FSH 为 5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的产生没有影响;当培养体系 FSH 浓度分别为 25 和 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,随着 CART 浓度的升高(0.01、0.1、1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),培养

液雌激素浓度有下降的趋势,但各组间差异不显著($P>0.05$)。但是,当 FSH 25 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,CART 0.1 和 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与对照组相比,颗粒细胞雌激素的产生明显受到抑制($P<0.05$)。但是,统计分析 FSH 和 CART 交互效应并不显著($P>0.05$);当培养体系添加 FSH 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,随着 CART 浓度的升高(0.01、0.1、1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),与对照组相比,各组雌激素浓度差异不显著($P>0.05$),这一点还需进一步的试验证明。



上标的大写字母和小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 显著水平上的比较结果,所标字母相异表示差异显著,所标字母相同表示差异不显著

Superscript small and capital letters indicate significant difference at the level of 0.05 and 0.01, values with the same letter is not significantly different and values with the different letters are significantly different at the 0.01 or 0.05 level

图 4 CART 对 FSH 诱导的猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素产生的影响

Fig. 4 Effects of CART on FSH-induced estradiol production of pig follicular granulosa cells after 168 h *in vitro* culture

总之,本研究表明,猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的产生是在 FSH 诱导下进行。在本研究设计的培养体系中,FSH 浓度为 25 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,颗粒细胞

产生的雌激素浓度最大;本研究还表明,CART 对 FSH 诱导的猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的产生有抑制作用,但抑制作用并不明显。

3 讨论

CART作为一种神经肽物质,其生理功能已经在人类以及许多哺乳动物身上被广泛研究,美国密歇根州立大学首次从繁殖机能方面对CART进行研究,已经通过试验证明,CART在一定浓度范围内能够抑制牛卵巢卵泡的正常发育,是导致牛卵巢卵泡发育迟缓,甚至闭锁的一个重要因素^[1,3-4,6]。在单胎哺乳动物牛上,已证实了CART mRNA有表达,并且对牛卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的分泌有影响。但在小型多胎哺乳动物鼠下丘脑有表达^[7],而在其卵巢上不表达^[8]。前期研究已经证明,CART mRNA同样在猪的卵泡颗粒细胞中有表达,且与野猪的同源序列相似度高达99%,遗传距离也最为接近^[2]。本试验将猪作为研究对象,展开CART在FSH诱导下对猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素分泌影响的相关研究。

FSH是卵巢卵泡颗粒细胞生长增殖与分化的决定因素,FSH受体主要存在于猪的卵巢卵泡颗粒细胞上,因此,FSH对其自身受体既有上调作用,又有下调作用^[9]。FSH能够刺激体外培养的颗粒细胞P450arom mRNA的转录,进而促进颗粒细胞雌激素合成能力的提高,而雌激素有较强的促有丝分裂作用,导致颗粒细胞有一定程度的增生反应^[10]。有研究证实,牛卵巢卵泡颗粒细胞的体外培养对FSH有剂量依赖性^[11]。本研究对猪卵巢卵泡颗粒细胞进行体外培养168 h后,对颗粒细胞生长情况的图像采集显示,当CART的浓度为 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着FSH浓度的逐渐加大,卵巢卵泡颗粒细胞的密度逐渐增大。从对猪卵巢卵泡颗粒细胞培养168 h后的激素测定水平中可以看到,当CART的浓度为 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着FSH浓度的升高,培养液颗粒细胞产生的雌激素的浓度明显增加,FSH浓度为 $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,颗粒细胞雌激素的水平最高,为 $(17\ 295.57 \pm 184.03) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由此得知,猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的产生需在FSH诱导下进行,FSH在一定浓度范围内对猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的分泌有促进作用。王妍等^[12]在2007年对小鼠卵巢卵泡颗粒细胞体外培养的结果表明,添加 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的FSH,在培养第4天时对卵巢卵泡颗粒细胞表现出明显的促增殖作用。高庆华等^[13]研究认为,在生理浓度范围内,FSH浓度越高对颗粒细胞增生作用的刺激越强,随着颗粒细

胞的增多,雌激素的分泌量也随之增加。这些相关研究结果也进一步证实了本试验得出的FSH对颗粒细胞雌激素的分泌有促进作用的结论。

卵泡发育过程中颗粒细胞会通过产生抑制素和活化素来调节卵泡发育,前者被认为是卵泡的生存因子,而后者被认为是卵泡闭锁因子^[14]。卵泡闭锁因子能抑制垂体细胞合成及分泌FSH,从而导致其它卵泡闭锁^[15]。卵泡生存因子是由颗粒细胞分泌,能刺激垂体细胞合成及分泌FSH,其产量决定卵泡对FSH的敏感性,以选择优势卵泡并抑制LH对卵泡颗粒细胞的作用,防止卵泡过早黄素化^[16]。动物试验证明,活化素可引起卵泡闭锁和颗粒细胞凋亡,而抑制素则可明显地增加家畜性未成熟卵巢中中等大小卵泡的数量^[17]。

在猪卵巢卵泡颗粒细胞体外培养168 h后,对颗粒细胞生长情况的图像采集显示,当FSH浓度为5和 $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,随着CART浓度的逐渐加大,卵巢卵泡颗粒细胞的密度逐渐减小。由此得知,CART对猪卵巢卵泡颗粒细胞的增殖有抑制作用。近年来,有研究结果证明^[18-19,5],在一定的生理浓度下,CART能够抑制体外培养牛卵泡颗粒细胞雌激素的分泌,对卵泡的发育有负调控作用。在本研究中,通过对颗粒细胞生长情况的图像研究后证实,CART对猪卵巢卵泡颗粒细胞的增殖有抑制作用,同时也表明,CART在导致卵巢卵泡颗粒细胞凋亡的复杂调控过程中是一种促进信号^[20],但本研究中CART的抑制效果并不显著。

卵巢周期是繁殖过程的一系列中心事件,因为只有成熟卵巢的卵泡才能释放卵子并受精。然而,大于99%的卵巢卵泡在其发生过程中死亡而不能排卵^[21]。在牛和人类,卵巢中的卵泡以卵泡发育波的形式出现,在牛上往往出现2~3个卵泡发育波^[22]。FSH启动原始卵泡发育后,又进一步促进部分卵泡形成腔,进入有腔卵泡的生长期。在对牛卵泡发育的研究表明,当原始卵泡发育到了3~4 mm有腔卵泡期,通常就会出现1次FSH水平的瞬时提高^[23]。有腔卵泡的继续生长依赖于FSH的支持,FSH刺激有腔卵泡的生长发育,同时又刺激颗粒细胞产生FSH受体(FSHR),随着FSHR数量的增加,卵泡颗粒细胞对FSHR反应也就越大,从而促使颗粒细胞不断发育^[24]。FSH短暂的增加,并刺激一群小的有腔卵泡开始发育,这是一个卵泡发育波的开始,其中只有1个优势卵泡继续发育到排卵

的大小,这时 FSH 的浓度下降,并产生大量的雌激素,而其余的从属卵泡失去了产生雌激素的能力,并通过卵泡闭锁而死亡。近年来许多试验证明,在卵泡发育过程中,雌激素起着关键作用。雌激素不仅促使卵母细胞成熟^[25-26],而且能提高卵泡对 FSH 的摄取,还可以通过提高 FSH 的浓度来刺激 cAMP 的积累能力,从而进一步提高卵巢卵泡颗粒细胞对 FSH 的反应性,还能增进 FSH 刺激其受体作用^[27],能使颗粒细胞促黄体生成素受体的作用明显增加,大大提高卵泡对 2 种促性腺激素的反应性,最终促使卵泡发育成熟并排卵。卵巢内卵泡雌激素产生能力的丧失导致卵泡闭锁^[6]。综上所述,卵泡的发育受动物机体内多种调控机制干预,其中在牛和羊上,CART 抑制 FSH 依赖的体外培养卵泡颗粒细胞雌激素的分泌^[18,5,28],从而导致卵泡闭锁。但是在猪上,CART 对卵泡颗粒细胞雌激素的产生并不起明显的抑制作用,这说明并不像单胎的牛、羊,CART 在猪卵泡发育过程中,可能并非是个主要的局部负调控因子,这需要进一步的研究探讨。

4 结 论

猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的产生需在 FSH 诱导下进行;CART 对 FSH 诱导的猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素的产生在 FSH 为 25 和 50 ng · mL⁻¹ 时有抑制作用,但抑制效果并不显著。由此推断,CART 在猪卵泡发育过程中,可能并非是个主要的局部负调控因子。

参考文献:

- [1] SEN A, BETTEGOWDA A, JIMENEZ-KRASSEL F, et al. Cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) regulation of follicle stimulating hormone signal transduction in bovine granulosa cells [J]. *Endocrinology*, 2007, 33(2): 1-18.
- [2] 李鹏飞, 李富禄, 于秀菊, 等. 猪 CART mRNA 全 CDS 区序列的克隆与表达载体的构建[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2011, 40(6): 610-613.
- [3] ARITRO S, LV L H, BELLO N, et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) accelerates the termination of FSH induced ERK1/2 and AKT activation by regulating the expression and degradation of specific MAP kinase phosphatases [J]. *Mol Endocrinol*, 2008, (22): 2655-2676.
- [4] LV L H, JIMENEZ-KRASSEL F, SEN A, et al. Evidence supporting a role for cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) in control of granulosa cell estradiol production associated with dominant follicle selection in cattle [J]. *Biol Reprod*, 2009, (81): 580-586.
- [5] SEN A, BETTEGOWDA A, JIMENEZ-KRASSEL F, et al. Cocaine and amphetamine-regulated transcript regulation of follicle-stimulating hormone signal transduction in bovine granulosa cells [J]. *Endocrinology*, 2007, 148: 4400-4410.
- [6] KOBAYASHI Y, JIMENEZ-KRASSEL F, LI Q L, et al. Evidence that cocaine- and amphetamine-regulated transcript is a novel intraovarian regulator of follicular atresia [J]. *Endocrinology*, 2004, 145 (11): 5373-5383.
- [7] JONES D C, KUHAR M J. Cocaine-amphetamine-regulated transcript expression in the rat nucleus accumbens is regulated by adenylylcyclase and the cyclic adenosine 50-monophosphate/protein kinase a second messenger system [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006; 317: 454-461.
- [8] MURPHY K G, ABBOTT C R, MAHMOUDI M, et al. Quantification and synthesis of cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide (79-102)-like immunoreactivity and mRNA in rat tissues [J]. *J Endocrinol*, 2000, 166: 659-668.
- [9] 杨增明, 孙青原, 夏国良. 生殖生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 571-581.
- [10] 高庆华, 周 虚. 促卵泡激素和胰岛素对牛卵泡颗粒细胞长期培养的影响[J]. 中国兽医学报, 2006, 7: 442-447.
- [11] KURAN M, BROADBENT P J, HUTCHINSON J S M. Follicle-stimulating hormone stimulated differentiation and progesterone production of bovine granulosa cells in culture [J]. *Anim Reprod Sci*, 1995, 39: 237-249.
- [12] 王 妍, 赵晓娥. 小鼠卵巢颗粒细胞的体外培养[J]. 西北农林科技大学学报, 2007, 8: 11-14.
- [13] 高庆华, 蒋超祥, 韩春梅. FSH 和胰岛素对牛卵泡颗粒细胞长期培养的影响[J]. 中国草食动物, 2004, 24(4): 16-18.
- [14] 王 锋. 卵泡生长发育成熟及其分泌调控[J]. 国外兽医学-畜禽, 1994, 19(1): 1-8.
- [15] TROWBRIDGE I S, COLLAWN J F, HOPKINS C R. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway [J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1993, 9: 129-161.

- [16] 张 静,郑月慧,郑丽萍. 排卵前期卵泡颗粒细胞端粒酶的表达及其影响因素[J]. 生理学报,2005,57(6): 714-718.
- [17] WILLIAM J M. Programmed cell death in preovulatory ovine follicle [J]. *Biol Reprod*, 1995, 53(1): 8-12.
- [18] LV L H, JIMENEZ-KRASSEL F, SEN A, et al. Evidence for local inhibitory effect of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (cart) peptide on lh-induced thecal androstenedione production[J]. *Biol Reprod*, 2007, (77): 179.
- [19] ROSALES-TORRES A M, AVALOS-RODRÍGUEZ A, VERGARA-ONOFRE M, et al. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: histology, flow cytometry, intemcleosomal dna fragmentation and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid [J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55(3): 270-281.
- [20] WOOD J R, STRAUSS J F 3rd. Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2006, 3(1):33-46.
- [21] 刘忠华, 梁轶群, 岳奎忠. 猪卵泡闭锁过程中颗粒细胞凋亡现象的检测[J]. 解剖学报, 2002, 33(4):160-163.
- [22] AUSTIN E J, MIHM M, EVANS A C, et al. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle[J]. *Biol Reprod*, 2001, 64:839-848.
- [23] VITALE A M, ABRAMOVICH D, PELUFFO M C, et al. Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist and antagonist on proliferation and apoptosis of human luteinized granulosa cells[J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(4): 1064-1067.
- [24] 董 伟. 家畜繁殖学(修订版)[M]. 北京:农业出版社, 1989:65-66.
- [25] LV L H, YUE W B, LIU W Z, et al. Effects of sperm capacitation treatments and *in vitro* culture systems on development of *in vitro* fertilized embryos derived from prepubertal boer goat oocytes[J]. *Asia-Austra J Anim Sci*, 2009, 22(7): 969-976.
- [26] LV L H, YUE W B, LIU W Z, et al. Effect of oocyte selection, estradiol and antioxidant treatment on *in vitro* maturation of oocytes collected from prepubertal chinese boer goats[J]. *Ita J Anim Sci*, 2010, 9(1):50-54.
- [27] 朱长虹, 吴重聪, 熊忠明, 等. FSH 诱导转染细胞和颗粒细胞 FSH 受体内在化[J]. 中华男科学, 2001, 7(1): 17-19.
- [28] 张 涛, 李富禄, 黄 洋, 等. CART 对 FSH 诱导的绵羊卵巢卵泡颗粒细胞雌激素产生影响的研究[C]. 中国畜牧兽医学会动物繁殖学分会第十五届学术研讨会论文集, 2010: 287-288.

(编辑 郭云雁)