

抑制素对绵羊颗粒细胞雌激素和孕酮分泌及相关基因表达的影响

李 婷, 马爱团, 刘月琴, 高 昆, 张继伟, 张英杰*

(河北农业大学动物科技学院, 保定 071000)

摘 要: 本试验旨在研究 RNA 干扰抑制素 α 亚基(Inhibin α -subunit, $INH\alpha$)基因和添加抑制素 A(InhibinA)对绵羊颗粒细胞雌激素(Estrogen, E2)和孕酮(Progesterone, P)分泌及相关基因表达的影响,以探索抑制素在绵羊颗粒细胞 E2 和 P 分泌中的作用。从 1.0~1.5 岁小尾寒羊的卵泡(3~7 mm)中分离培养颗粒细胞,分为 2 个处理组:干扰组(脂质体介导法转染颗粒细胞)和 InhibinA 添加组(200 ng \cdot mL⁻¹)。利用 ELISA 试剂盒检测 E2 和 P 的分泌,荧光定量 RT-PCR 检测 E2 和 P 的分泌相关基因(*CYP11*、*3 β HSD* 和 *CYP19*)的表达量。结果表明,与对照组相比,干扰组 siRNA 转染颗粒细胞 48 h 后, $INH\alpha$ 基因的抑制率达 87%, E2 和 P 的分泌量显著降低($P < 0.05$); InhibinA 添加组 E2 和 P 的分泌水平显著升高($P < 0.05$); 干扰组 *3 β HSD* 和 *CYP19* 的 mRNA 表达量显著降低($P < 0.05$), *CYP11* 的表达量显著升高($P < 0.05$); InhibinA 添加组 *CYP19*、*CYP11* 和 *3 β HSD* 的 mRNA 表达水平均显著升高($P < 0.05$)。综上表明,抑制素在绵羊颗粒细胞中起关键调控作用,通过调节绵羊颗粒细胞类固醇激素的分泌参与调控卵泡发育和排卵过程。

关键词: 抑制素; 雌激素; 孕酮; 绵羊; 颗粒细胞; 基因表达

中图分类号: S826.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)09-1648-06

Effects of Inhibin on the Secretion of Estrogen, Progesterone and Expressions of Related Genes in Sheep Granulosa Cells

LI Ting, MA Ai-tuan, LIU Yue-qin, GAO Kun, ZHANG Ji-wei, ZHANG Ying-jie*

(College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of silencing the inhibin α -subunit ($INH\alpha$) gene or treatment with inhibinA on the secretion of estrogen (E2), progesterone (P) and expressions of related genes in sheep granulosa cells (GCs), explore the role of inhibin in the secretion of E2 and P. GCs were isolated from antral follicles (3-7 mm) obtained from the ovaries of small-tailed Han sheep (1.0-1.5 years old). GCs were transfected with siRNA or treated with inhibinA (200 ng \cdot mL⁻¹). The concentrations of E2 and P were tested by ELISA. The mRNA levels of related-genes (*CYP11*, *3 β HSD* and *CYP19*) were analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results showed that siRNA was transfected into GCs at 48 h and the silencing efficiency of $INH\alpha$ was 87%. Knockdown of $INH\alpha$ by siRNA decreased the concentrations of E2 and P at 48 h compared with the control ($P < 0.05$). Secretion of E2 and P were increased in the group treated with inhibinA ($P < 0.05$). Knockdown of $INH\alpha$ by siRNA decreased the mRNA expressions of *3 β HSD* and *CYP19*, and increased the mRNA expression of *CYP11* ($P <$

0.05)。The mRNA expressions of 3β -HSD, CYP11 and CYP19 were increased in the group treated with inhibinA ($P < 0.05$)。These results indicated that inhibin was a key regulator and involved in the process of follicular growth and ovulation by regulating the secretion of steroid hormone in sheep GCs.

Key words: inhibin; estrogen; progesterone; sheep; granulosa cells; gene expression

卵泡颗粒细胞的生长和凋亡,对卵泡的发育起着重要作用。卵泡发育是受颗粒细胞分泌的各种因子调节的复杂生物过程,尤其是类固醇激素如雌激素(E2)和孕酮(P)^[1-2]。类固醇激素的合成受一系列酶的控制,其中 CYP19、CYP11 和 3β -HSD 是其合成通路的关键酶^[3-4]。抑制素是卵巢颗粒细胞中类固醇激素合成的重要调节因子^[5-6],它可以通过调节类固醇激素合成相关基因(CYP11、 3β -HSD 和 CYP19)的表达或活性调控类固醇激素的合成,参与调控卵泡的生长发育与排卵,进而调节动物的繁殖性能^[7-8]。

抑制素主要是卵泡颗粒细胞分泌的,它是由 α 、 β 两个不同的亚基组成,其中 β 亚基有 A、B 两种形式, α 和 β A 亚基构成抑制素 A(InhibinA), α 和 β B 形成抑制素 B(InhibinB)。抑制素的结合位点和受体位于垂体、卵泡膜细胞和卵泡颗粒细胞中^[9-11],它可以通过内分泌和局部作用的方式调节卵泡发育^[12-16]。许多研究表明,抑制素通过内分泌作用调节 E2 的分泌,从而调控垂体 FSH 的分泌^[17-21]。另外,抑制素可通过局部调节作用增强 LH 刺激膜细胞雄激素的合成效应,促进雄激素的合成^[22-23]。但是,颗粒细胞来源的抑制素对 E2 和 P 局部调节的影响结果还存在争议。研究发现,添加抑制素抗体促进牛和猪颗粒细胞分泌 E2^[24-26]。但是 B. K. Campbell 等^[27]研究表明,抑制素的添加促进绵羊颗粒细胞产生 E2,C. D. Smyth 等^[22]在大鼠卵泡中发现,免疫中和内源性的抑制素导致 E2 分泌的降低和 P 的增加,当抗体处理的卵泡中补充外源性抑制素时,E2 分泌得到恢复,并且 P 减少。抑制素通过改变 CYP11 和 CYP19 的表达影响 E2 和 P 的分泌^[25,28]。另外,抑制素对灵长类动物颗粒细胞基础水平和促性腺激素诱导的 E2 的分泌没有影响^[29]。抑制素对 E2 和 P 有重要的调节作用,但针对绵羊颗粒细胞的研究结果还比较少,且颗粒细胞来源的抑制素对 E2 和 P 局部作用的调控结果还不清楚。

本实验室已构建了靶向抑制素 α 亚基(Inhibin α -subunit, INH α)基因的 siRNA,干扰效率达 85%

以上,并通过 RNA 干扰 INH α 的表达后对绵羊颗粒细胞的增殖和凋亡进行了大量研究,但关于 RNA 干扰 INH α 的表达及添加 InhibinA 后,对绵羊颗粒细胞 E2 和 P 的分泌及相关基因的变化还需要进一步研究。本研究以原代绵羊颗粒细胞为模型,通过 siRNA 干扰内源性 INH α 基因的表达和添加外源 InhibinA 两种处理,研究抑制素对绵羊颗粒细胞 E2 和 P 的分泌及相关基因(CYP11、 3β -HSD 和 CYP19)表达的影响,为研究卵泡抑制素对绵羊卵泡发育的局部调节作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从唐县屠宰场采集 1.0~1.5 岁小尾寒羊的卵巢,立即放入含双抗的 37 °C 生理盐水的保温瓶中,并在 3 h 内运回实验室。

1.2 方法

1.2.1 绵羊卵巢颗粒细胞的分离与培养 根据 J. Y. Peng 等^[30]的颗粒细胞分离方法,从绵羊卵泡分离并收集颗粒细胞,加入含 10% FBS(Gibco)和 1% 青链霉素混合液的 DMEM/F12(Gibco)培养液重悬细胞。调整细胞密度,于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,更换为含有 1% 的青链霉素混合液(Gibco)、0.2% BSA(Sigma)、1% 的 ITS(胰岛素-转铁因子-硒补充剂,Gibco)和 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 雄烯二酮(美伦)的 DMEM/F-12 培养液培养 12 h 后,添加 InhibinA(200 ng \cdot mL⁻¹,ProSpec)对细胞进行刺激,并以未处理的细胞为空白对照(Control),每组设 3 个重复孔。

1.2.2 siRNA 的设计合成和转染 在 GenBank 上搜索绵羊 INH α 基因 mRNA 序列(NM_001308579.1),设计合成针对 INH α 基因的 siRNA 干扰序列(siINH α)和阴性对照(siNC),采用转染试剂 LipofectamineTM RNAiMAX(Invitrogen),按说明书转染 siINH α 和 siNC 至绵羊颗粒细胞,每组设 3 个重复孔。处理 48 h 后,提取总 RNA 进行检测。

1.2.3 雌激素和孕酮的测定 RNA 干扰组和

InhibinA 添加组分别处理细胞 48 h 后,收集培养液上清。采用 P 和 E2 ELISA 试剂盒(北京华英生物技术研究)检测细胞培养液中 E2(灵敏度 $<4 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,批内变异系数 $<15\%$,批间变异系数 $<15\%$)和 P(灵敏度 $<0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,批内变异系数 $<15\%$,批间变异系数 $<15\%$)的浓度,经显色后在酶标仪测定吸光值(OD 值),通过拟合浓度-吸光度曲线,计算出待测细胞培养液中 E2 和 P 的含量。

1.2.4 qRT-PCR 检测雌激素和孕酮分泌相关基因

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	正向引物序列 (5'→3') Forward primer sequences	反向引物序列 (5'→3') Reverse primer sequences
<i>INHα</i>	CTGTGGGGATGAGCCAGATG	CAGGGGCTCAGAGCTATTGG
<i>CYP19</i>	GCACTCTGGAAAGCTGTTCG	CACGTCCACATAGCCCAAGT
<i>CYP11</i>	GTTTCGCTTTGCTTTGAGTC	ACAGTTCTGGAGGGAGGTTGA
<i>3β-HSD</i>	GGAGACATTCTGGATGAG CAG	TCTATGGTGCTGGTGTGG A
<i>GAPDH</i>	CTGACCTGCCGCTGGAGAAA	GTAGAAGAGTGAGTGTGCTGTT

1.2.5 数据分析 采用 SPSS 19.0 的 *t* 检验对数据进行分析。试验数据以“平均值±标准差”表示。 $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 siRNA 的干扰效率

siRNA 转染颗粒细胞 48 h 后,与阴性对照相比,颗粒细胞 *INH α* mRNA 的水平显著降低($P<0.05$),抑制率为 87%(表 2)。

表 2 转染后绵羊颗粒细胞 *INH α* 基因 mRNA 的相对表达水平

Table 2 The mRNA expression of *INH α* in sheep granulosa cells after transfection

组别 Group	<i>INHα</i> mRNA 的相对表达量 The relative mRNA expression of <i>INHα</i>
阴性对照 siNC	1.00±0.06
转染 siINH α	0.13±0.03*

*. $P<0.05$. 下同

*. $P<0.05$. The same as below

2.2 siRNA 干扰 *INH α* 基因对绵羊颗粒细胞雌激素和孕酮分泌的影响

干扰组 siRNA 转染颗粒细胞 48 h 后,测定培

mRNA 的表达 干扰组和 InhibinA 添加组处理细胞 48 h 后,Trizol(Invitrogen)提取细胞总 RNA,利用反转录试剂盒(TaKaRa),反转录为 cDNA。使用荧光定量 PCR 仪(ABI Step One Plus™)进行检测(SybrGreen qPCR mastermix 试剂购自 DBI)。以 *GAPDH* 基因为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法计算各检测基因的相对表达量。qRT-PCR 检测目的基因 *INH α* 、E2 和 P 分泌相关基因(*CYP19*、*CYP11* 和 *3 β -HSD*)的相对表达量。引物序列见表 1。

养液中 E2 和 P 分泌量的结果见表 3。在转染 48 h 时,siRNA 干扰组颗粒细胞 E2 和 P 的分泌量均显著低于阴性对照组($P<0.05$)。

表 3 干扰 *INH α* 对颗粒细胞中 E2 和 P 分泌的影响

Table 3 The effects of silencing *INH α* on the secretion of E2 (pg·mL⁻¹) and P (ng·mL⁻¹) in granulosa cells

组别 Group	E2/(pg·mL ⁻¹)	P/(ng·mL ⁻¹)
阴性对照 siNC	77.15±1.90	1.16±0.09
转染 siINH α	65.16±2.91*	0.67±0.32*

2.3 抑制素 A 的添加对绵羊颗粒细胞雌激素和孕酮分泌的影响

InhibinA 处理颗粒细胞 48 h 后,E2 和 P 的分泌量均显著高于空白对照组($P<0.05$)(表 4)。

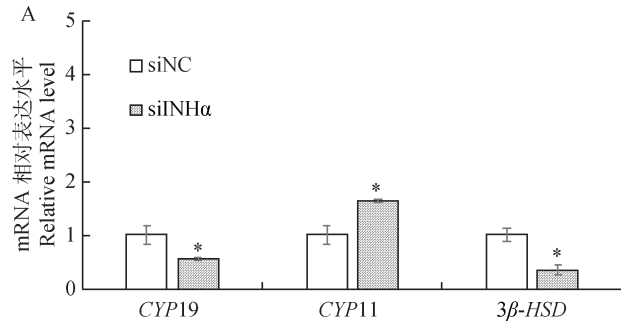
表 4 InhibinA 对颗粒细胞中 E2 和 P 分泌的影响

Table 4 The effects of inhibinA on the secretion of E2 and P in granulosa cells

组别 Group	E2/(pg·mL ⁻¹)	P/(ng·mL ⁻¹)
空白对照 Control	92.67±6.43	0.90±0.08
抑制素 A InhibinA	113.34±7.63*	1.25±0.11*

2.4 抑制素对绵羊颗粒细胞雌激素和孕酮分泌相关基因表达的影响

干扰组 E2 和 P 分泌相关基因的相对表达量结果见图 1A。siRNA 转染后,干扰组中与 E2 分泌相关的芳香化酶 *CYP19* 基因相对表达量受到抑制,与阴性对照组相比差异显著($P < 0.05$);与 P 分泌相



关的 *3β-HSD* 基因相对表达量显著降低($P < 0.05$),而 *CYP11* 的表达量显著升高($P < 0.05$)。InhibinA 添加组 E2 和 P 分泌相关基因的相对表达量结果见图 1B。与空白对照组相比,*CYP19*、*CYP11* 和 *3β-HSD* 基因相对表达量均显著升高($P < 0.05$)。

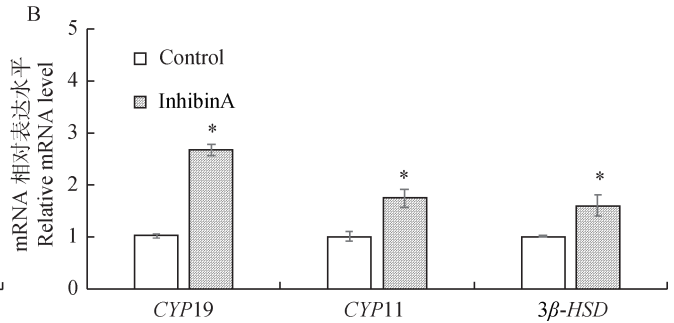


图 1 干扰 *INHα* (A) 和 InhibinA (B) 处理后绵羊颗粒细胞 *CYP19*、*CYP11* 和 *3β-HSD* mRNA 的表达

Fig. 1 Effect of treatment with silencing *INHα* gene (A) and inhibin A (B) on the mRNA expressions of *CYP19*, *CYP11* and *3β-HSD* in sheep granulosa cells

3 讨论

3.1 抑制素对颗粒细胞雌激素和孕酮分泌的影响

卵泡发育是受颗粒细胞分泌的各种因子调节的复杂生物过程,尤其受 E2 和 P 的调节。研究表明,抑制素可以调节 E2 和 P 的分泌^[7,31]。F. J. Chen 等^[32]研究发现,干扰鹅颗粒细胞 *INHα* 基因的表达后,E2 的浓度降低。L. Y. Geng 等^[33]超表达 *INHα* 48 h 后发现,抑制素促进 E2 分泌,抑制 P 分泌;而 96 h 后,E2 分泌受到抑制,P 分泌量不变。可能是因为超表达的 *INHα* 片段能够作为抑制素的对抗物,模拟抑制素亚基对颗粒细胞的作用,对抗颗粒细胞自身分泌的抑制素对 E2 分泌的负反馈作用,促进颗粒细胞分泌 E2。另外,抑制素抗体的添加,同样抑制 FSH 诱导的绵羊颗粒细胞和未成熟大鼠的整个卵泡中产生 E2^[22,27],说明抑制素对 E2 有促进作用。本研究得出,干扰绵羊颗粒细胞中 *INHα* 基因的表达,抑制了 E2 和 P 的分泌,添加 InhibinA 处理绵羊颗粒细胞,促进了 E2 和 P 的分泌。但有研究发现,转基因小鼠过表达 *INHα*,使得小鼠的排卵率降低,E2 分泌减少^[34-35]。在猪和牛颗粒细胞中添加抑制素抗体,阻断了猪和牛颗粒细胞产生的抑制素对 E2 的抑制效果,促进 E2 的分泌,说明抑制素对颗粒细胞产生的 E2 具有负反馈效应^[24-26]。还有研究表明,抑制素对灵长类动物和大鼠颗粒细胞基

础水平和 FSH 诱导的 E2 的分泌没有影响^[29,36]。以上研究结果不一致的原因,可能是由于物种、处理方法、培养基中添加的成分以及培养的时间不同造成的,也可能与颗粒细胞的分化阶段不同有关。

3.2 抑制素对颗粒细胞雌激素和孕酮分泌相关基因表达的影响

E2 和 P 在动物的生殖、发育、生长等方面起着重要作用,它的合成主要受 *CYP19*、*CYP11* 和 *3β-HSD* 的控制。研究表明,芳香化酶 *CYP19* 是雄激素向 E2 转化的关键酶,P 的产生与 *3β-HSD* 和 *CYP11* 的表达有关^[3]。L. P. Cai 等^[25]研究表明,添加 *INHα* 抗体,通过上调 *CYP19* 促进猪颗粒细胞 E2 的分泌。C. L. Lu 等^[28]研究发现 InhibinA 本身对大鼠颗粒细胞的 *CYP19* 和 *CYP11* mRNA 基础水平没有影响,但抑制了 FSH 诱导的类固醇生成相关基因 *CYP19* 和 *CYP11* mRNA 的表达,从而降低了 E2 和 P 的合成,这种抑制作用发生在 cAMP 通路的上游。本研究表明,干扰绵羊颗粒细胞中 *INHα* 基因的表达,显著下调 *CYP19* 和 *3β-HSD* mRNA 的表达,抑制 E2 和 P 的分泌;InhibinA 处理颗粒细胞,显著上调 *CYP19*、*CYP11* 和 *3β-HSD* 的表达,促进 E2 和 P 的分泌,与以上研究结果一致。但干扰颗粒细胞中 *INHα* 基因的表达,*CYP11* mRNA 的表达上调与 P 分泌的变化不一致。M. Sahmi 等^[37]研究表明,*3β-HSD* 对 P 的分泌起决定

性作用,而 CYP11 的表达与 P 的分泌无关。研究表明,添加 INH α 抗体,免疫中和内源性抑制素的生物学活性,促进猪颗粒细胞分泌 E2,但 CYP19 的表达上调不显著,认为 E2 的合成和分泌可能还涉及 CYP19 以外的因子^[24]。抑制素对 E2 和 P 的调控作用涉及多因子参与,其调控机制比较复杂,造成以上基因表达差异的原因还需进一步的研究。

4 结 论

RNA 干扰 INH α 基因的表达后,抑制了绵羊颗粒细胞 E2 和 P 的分泌,显著下调 CYP19 和 3β -HSD mRNA 的表达,上调 CYP11 mRNA 的表达;InhibinA 的添加,促进了绵羊颗粒细胞 E2 和 P 的分泌,显著上调 CYP19、CYP11 和 3β -HSD mRNA 的表达。抑制素通过改变类固醇生成相关基因的表达,进而调控绵羊颗粒细胞类固醇激素的分泌。

参考文献 (References):

- [1] KNIGHT P G, SATCHELL L, GLISTER C. Intra-ovarian roles of activins and inhibins[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 359(1-2): 53-65.
- [2] RIAZ H, DONG P, SHAHZAD M, et al. Constitutive and follicle-stimulating hormone-induced action of somatostatin receptor-2 on regulation of apoptosis and steroidogenesis in bovine granulosa cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 141: 150-159.
- [3] LAVOIE H A, KING S R. Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234(8): 880-907.
- [4] STOCCO D M, CLARK B J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells[J]. *Endocr Rev*, 1996, 17(3): 221-244.
- [5] KNIGHT P G, GLISTER C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary[J]. *Reproduction*, 2001, 121(4): 503-512.
- [6] HILLIER S G. Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries[J]. *J Endocrinol*, 1991, 131(2): 171-175.
- [7] HILLIER S G, TSONIS C G, WICKINGS E J, et al. Inhibition of FSH-stimulated granulosa cell function by a synthetic fragment of the porcine inhibin alpha-subunit; evidence for involvement of GnRH receptors[J]. *J Endocrinol*, 1987, 113(2): R3-R5.
- [8] SCHNEYER A L, SLUSS P M, WHITCOMB R W, et al. Precursors of α -inhibin modulate follicle-stimulating hormone receptor binding and biological activity[J]. *Endocrinology*, 1991, 129(4): 1987-1999.
- [9] LEWIS K A, GRAY P C, BLOUNT A L, et al. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling[J]. *Nature*, 2000, 404(6776): 411-414.
- [10] HERTAN R, FARNWORTH P G, FITZSIMMONS K L, et al. Identification of high affinity binding sites for inhibin on ovine pituitary cells in culture[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(1): 6-12.
- [11] MACCONELL L A, LEAL A M O, VALE W W. The distribution of betaglycan protein and mRNA in rat brain, pituitary, and gonads: implications for a role for betaglycan in inhibin-mediated reproductive functions[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(3): 1066-1075.
- [12] HILLIER S G, MIRÓ F. Inhibin, activin, and follistatin. Potential roles in ovarian physiology[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 687: 29-38.
- [13] VALE W, HSUEH A, RIVIER C, et al. The Inhibin/Activin family of hormones and growth factors [M]//SPORN M B, ROBERTS A B. Peptide Growth Factors and Their Receptors II. Berlin Heidelberg: Springer, 1990: 211-248.
- [14] FINDLAY J K, DRUMMOND A E, DYSON M, et al. Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 180(1-2): 139-144.
- [15] BILEZIKJIAN L M, BLOUNT A L, LEAL A M O, et al. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 225(1-2): 29-36.
- [16] KADARIYA I, WANG J X, REHMAN Z U, et al. RNAi-mediated knockdown of inhibin α subunit increased apoptosis in granulosa cells and decreased fertility in mice[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 152: 161-170.
- [17] DAN X G, LIU X R, HAN Y G, et al. Effect of the novel DNA vaccine fusing inhibin α (1-32) and the RF-amide related peptide-3 genes on immune response, hormone levels and fertility in Tan sheep[J]. *Anim Reprod Sci*, 2016, 164: 105-110.
- [18] RAMASWAMY S, POHL C R, MCNEILLY A S, et al. The time course of follicle-stimulating hormone suppression by recombinant human inhibin A in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(8): 3409-3415.

- [19] LIU Y P, MAO X B, WEI Y M, et al. Studies on enhancing embryo quantity and quality by immunization against inhibin in repeatedly superovulated Holstein heifers and the associated endocrine mechanisms [J]. *Anim Reprod Sci*, 2013, 142(1-2): 10-18.
- [20] BAHARELDIN-ALI A, QIN G S, GUO R H, et al. Endocrine and ovarian responses in water buffalo cows immunized against inhibin and subjected to the Ovsynch protocol[J]. *J Integr Agric*, 2015, 14(9): 1827-1837.
- [21] LIU Q, REHMAN Z U, LIU J J, et al. Nasal immunization with inhibin DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella choleraesuis* for improving ovarian responses and fertility in cross-bred buffaloes[J]. *Rerod Domest Anim*, 2017, 52(2): 189-194.
- [22] SMYTH C D, GOSDEN R G, MCNEILLY A S, et al. Effect of inhibin immunoneutralization on steroidogenesis in rat ovarian follicles *in vitro* [J]. *J Endocrinol*, 1994(3), 140: 437-443.
- [23] YOUNG J M, MCNEILLY A S. Inhibin removes the inhibitory effects of activin on steroid enzyme expression and androgen production by normal ovarian thecal cells[J]. *J Mol Endocrinol*, 2012, 48(1): 49-60.
- [24] LEI M M, CAI L P, LI H, et al. Transcriptome sequencing analysis of porcine granulosa cells treated with an anti-inhibin antibody [J]. *Reprod Biol*, 2017, 17(1): 79-88.
- [25] CAI L P, SUN A D, LI H, et al. Molecular mechanisms of enhancing porcine granulosa cell proliferation and function by treatment *in vitro* with anti-inhibin alpha subunit antibody[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13: 1-10.
- [26] 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[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(5): 1876-1886.
- [27] CAMPBELL B K, BAIRD D T. Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep[J]. *J Endocrinol*, 2001, 169(2): 333-345.
- [28] LU C L, YANG W, CHEN M, et al. Inhibin A inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing its receptor expression in cultured rat granulosa cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 298(1-2): 48-56.
- [29] HILLIER S G, MIRÓ F. Local regulation of primate granulosa cell aromatase activity[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1993, 44(4-6): 435-439.
- [30] PENG J Y, XIN H Y, HAN P, et al. Expression and regulative function of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in the goat ovary and its role in cultured granulosa cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 412: 104-115.
- [31] MIRÓ F, HILLIER S G. Relative effects of activin and inhibin on steroid hormone synthesis in primate granulosa cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 75(6): 1556-1561.
- [32] CHEN F J, JIANG X P, CHEN X P, et al. Effects of downregulation of inhibin α gene expression on apoptosis and proliferation of goose granulosa cells[J]. *J Genet Genomics*, 2007, 34(12): 1106-1113.
- [33] GENG L Y, FANG M, YI J M, et al. Effect of overexpression of inhibin α (1-32) fragment on bovine granulosa cell proliferation, apoptosis, steroidogenesis, and development of co-cultured oocytes[J]. *Theorigenology*, 2008, 70(1): 35-43.
- [34] CHO B N, MCMULLEN M L, PEI L, et al. Reproductive deficiencies in transgenic mice expressing the rat inhibin α -subunit gene[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(11): 4994-5004.
- [35] MCMULLEN M L, CHO B N, YATES C J, et al. Gonadal pathologies in transgenic mice expressing the rat inhibin α -subunit[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(11): 5005-5014.
- [36] HUTCHINSON L A, FINDLAY J K, DE VOS F L, et al. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor- β and bovine Activin-A on granulosa cell differentiation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 146(3): 1405-1412.
- [37] SAHMI M, NICOLA E S, SILVA J M, et al. Expression of 17 β - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells *in vitro* [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 223(1-2): 43-54.