

FSH 通过 AKT/FOXO1 通路调控绵羊卵泡颗粒细胞增殖的研究

刘春洁 王兆琛 杜炜 赵勇超 张家新*

(内蒙古农业大学 动物科学学院/内蒙古自治区动物遗传育种与繁殖重点实验室,呼和浩特 010018)

摘要 旨在研究 FSH-AKT-FOXO1 途径调控绵羊卵泡颗粒细胞增殖机制。利用不同浓度 FSH 处理绵羊颗粒细胞(GCs),采用 CCK-8 法检测细胞活性,流式细胞仪测定细胞凋亡和细胞周期变化,Western-Blot 检测 p-AKT 和 p-FOXO1 蛋白质表达,qPCR 分析 *PCNA*、*CCnd-2* 和 *Bcl-2* 基因表达量变化。结果表明:10 ng/mL 的 FSH 能显著提高 GCs 活性,抑制细胞凋亡($P < 0.05$);AKT/FOXO 信号通路的抑制剂 AT7867 预处理 GCs 后明显降低其活性($P < 0.05$);在 FSH 的作用下,GCs 中 AKT 蛋白的磷酸化水平显著升高,而 FOXO1 的磷酸化水平显著降低($P < 0.05$),同时显著上调了 *PCNA*、*CCnd-2* 和 *Bcl-2* 的表达水平($P < 0.05$)。本研究表明 FSH 通过 AKT/FOXO1 信号途径促进了绵羊 GCs 的生长、增殖。

关键词 绵羊;颗粒细胞;FSH;AKT/FOXO1 信号途径;绵羊

中图分类号 S826.2

文章编号 1007-4333(2019)03-0045-07

文献标志码 A

Follicle-stimulating hormone regulating the proliferation of ovine follicular granulosa cells through AKT/FOXO1 pathway

LIU Chunjie, WANG Zhaochen, DU Wei, ZHAO Yongchao, ZHANG Jiaxin*

(College of Animal Science/Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Inner Mongolia Autonomous Region, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract The purpose of this study was to investigate the proliferation of ovine follicular granulosa cells (GCs) regulated by FSH-AKT-FOXO1 pathway. After GCs were treated with difference concentrations FSH, the cells' viability were measured by CCK-8 assays. The apoptosis and cell cycle were assayed by Flowcytometry. The phosphorylation level of AKT and FOXO1 protein were detected by Western-Blot. The transcriptional profile of *PCNA*, *CCnd-2* and *Bcl-2* were detected by qRT-PCR. The results showed that: adding 10 ng/mL FSH in the culture medium significantly increased the viability of cells and inhibited apoptosis ($P < 0.05$). The viability of GCs decreased significantly after pre-treatment with the inhibitor AT7867 of AKT/FOXO1 signal pathway ($P < 0.05$). FSH significantly promoted AKT phosphorylation and decreased FOXO1 phosphorylation, FSH significantly up-regulated the expressions of *CCnd-2*, *PCNA* and *Bcl-2* mRNA. In conclusion, FSH promoted the growth and proliferation of ovine follicular granulosa cells through AKT/FOXO1 pathway.

Keywords ovine; granulosa cell; FSH; AKT/FOXO1 signal pathway

哺乳动物卵泡发育过程中,超过 99% 的卵泡会发生闭锁,卵泡闭锁是卵巢卵泡发育、成熟、排卵过程中重要的生理过程。如果这一过程不能正常进行,往往会导致雌性动物多囊卵巢综合征和卵巢早

衰,甚至不孕不育^[1-2]。已有研究表明卵泡闭锁与 GCs 凋亡密切相关,主要体现 DNA 碎片化和促凋亡基因表达显著上调^[3]。卵泡发育是一个相对复杂的过程,主要受促性腺激素的调控^[2,4]。其中促卵

收稿日期:2019-09-28

基金项目:国家自然科学基金项目(31460598)

第一作者:刘春洁,博士研究生,E-mail:guilt369@163.com

通讯作者:张家新,教授,主要从事动物繁殖技术与胚胎工程研究,E-mail:zjxcu@163.com

泡素(FSH)作为卵泡生长、发育和优势卵泡选择的一种重要的促性腺激素,同时还具有促进GCs增殖分化的功能^[5-7]。这一过程是通过激活GCs的多个信号级联引起FSH生理机制应答,包括蛋白激酶A(PKA),蛋白激酶B(PKB/AKT),p38丝裂原活化蛋白激酶(p38-MAPK)和细胞外信号调节激酶1和2(ERK1/2)^[8]。

在小鼠细胞研究中发现,通过减缓FOXO1转录抑制可以影响细胞中细胞周期蛋白(*Ccnd-2*)的表达^[9]。研究发现敲除小鼠*Ccnd-2*基因后,细胞增殖被阻滞^[9]。FOXO1的转录抑制也可以影响细胞核抗原(PCNA)基因的表达,PCNA是一种与增殖相关蛋白DNA合成有关的基因,起初表达于初级卵泡的GCs,在FSH作用下其表达量增加^[10-11]。*Bcl-2*作为抗细胞凋亡家族蛋白,定位于线粒体膜,参与GCs的凋亡,其作用机制同样受到FOXO1转录调控^[12]。FOXO1基因具有调节细胞凋亡,细胞周期停滞,细胞稳态等功能^[9]。由于FOXO1结合DNA,抑制或激活靶基因特异性转录^[13]。而FOXO1结合DNA能力主要受AKT磷酸化作用,当未发生磷酸化时,FOXO1定位于细胞核,通过与其靶基因结合到FOXO1识别元件(FRE)上,发挥生物学活性^[13-14]。

FOXO1是FSH信号通路的靶分子,受FSH的负调控。FSH通过PKB/AKT通路引起FOXO1的磷酸化失活,从而失去对靶基因的转录调节作用^[15]。因此,FSH维持卵泡生长发育的功能可能与FSH对FOXO1的抑制有关。其在GCs上发挥的潜在机制仍有待进一步探究。关于FSH通过AKT/FOXO1通路调控卵泡颗粒细胞增殖的研究大多数是针对小鼠等试验动物,在家畜上研究较少,因此,本试验拟用绵羊卵巢GCs,对绵羊GCs用不同浓度FSH处理后,利用CCK-8法检测细胞活性,AnnexinV-FITC测定细胞凋亡和细胞周期变化,Western-Blot检测p-AKT和p-FOXO1蛋白质表达;qPCR分析PCNA、*CCnd-2*和*Bcl-2*基因表达量变化,以期探究FSH通过AKT/FOXO1信号通路对绵羊GCs的调节作用,为提高母畜繁殖性能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本地屠宰场获得绵羊(24~36月龄,体重平均

83 kg)卵巢,去掉系膜等残余组织,使用37℃生理盐水洗涤3次,置含有预热37℃生理盐水保温杯内,并于2~3 h内送至实验室,然后再预热37℃,添加青霉素合剂的生理盐水洗涤卵巢3遍,将卵巢放于预热的灭菌生理盐水,置37℃水浴锅,待用。

1.2 试验试剂

促卵泡激素FSH(Bioniche,加拿大);DMEM/F12培养基(Gibco,美国);胎牛血清(HyClone,美国);电转液购自(Biosharp,中国);0.45 μm PVDF膜(Millipore,美国);AKT磷酸化抗体、FOXO1磷酸化抗体、β-actin抗体、AKT抑制剂AT7867(MCE,美国);HRP标记山羊抗兔IgG、HRP标记山羊抗鼠IgG、蛋白Marker、ECL底物液、Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Scientific,美国);Annexin-FITC/PI(Vazyme,美国);CCK-8(Beyotime Biotechnology,中国)。

1.3 试验方法

1.3.1 GCs收集

在超净台内用眼科剪将卵巢上的卵泡小心分离,用PBS尽可能将卵泡周围的组织清洗干净。收集直径4~6 mm大小卵泡。在盛有PBS的凹形皿内,用眼科剪将卵泡轻轻剪开,用刮刀沿卵泡内壁适度刮取细胞,置于含青霉素链霉素的PBS液中,并清洗3次,然后用添加0.3%牛血清白蛋白,3%胎牛血清,1%青霉素合剂的DMEM/F12培养基重悬细胞,PI染色计数,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL,转移到1.5 mL的离心管内,1400 r/min离心5 min后弃上清,立即将细胞投入液氮,后放入-80℃冰箱保存,用于后续RNA提取。

1.3.2 不同浓度FSH和抑制剂AT7867对GCs增殖影响

将分离纯化的绵羊颗粒细胞按相同浓度接种至96孔培养板中,每孔细胞进行随机分组进行后续试验。试验一将分组的每孔细胞分别添加0、5、10和20 ng/mL FSH。培养24 h后,采用CCK-8法对不同时间检测细胞活性。观察FSH对绵羊卵巢GCs活性的影响。每组数据重复3次以上。试验二将分组的每孔细胞分别添加0、5、10、20和40 μmol/L抑制剂AT7867,试验方法同试验一。观察抑制剂AT7867对卵巢GCs培养的影响。每组试验各重复3次以上。

1.3.3 GCs周期检测

培养24 h获得细胞,用不含EDTA的胰蛋白

酶室温消化 15~20 min, 消化后经 PBS 清洗 2~3 次, 1 400 r/min, 离心 5 min 后, 收集细胞沉淀后用 70% 预冷乙醇固定 24 h 左右。然后收集不同处理后固定的细胞样本, 经 PBS 洗涤 2~3 次后, 根据细胞周期试剂盒测定不同处理样本, 每个样本添加 100 μ L Rnase 酶吹打均匀后, 37 $^{\circ}$ C 处理 30 min, 然后各孔添加 400 μ L PI 染液, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 使用流式仪细胞检测细胞周期。

1.3.4 GCs 凋亡检测

将待检测细胞从培养箱取出, 然后用预冷 PBS 清洗细胞 2~3 次; 各孔加 500 μ L 不含 EDTA 的胰蛋白酶, 室温消化, 待细胞完全脱落, 用移液枪轻轻吹打使细胞分散; 将所吸出 EP 管中培养液加到对应各孔细胞内, 终止胰蛋白酶消化; 然后将细胞悬液转入 5 mL EP 管内, 1 400 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 用 1 mL PBS 轻轻吹起沉淀细胞, 洗涤 2~3 次, 1 400 r/min, 离心 5 min 后弃上清; 按照细胞凋亡检测试剂盒说明书, 每个样本加入 500 μ L 结合缓冲液重悬细胞, 然后加入 5 μ L AnnexinV-FITC 和 5 μ L PI, 轻轻混匀, 室温避光(锡箔纸)孵育 10~30 min,

流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3.5 qPCR 检测 GCs 中基因表达

采用 TRNzol 法提取组织样品总 RNA, 使用 NanoDropTMND-2000 测定 RNA 浓度和纯度。要求 A260/280 介于 1.8~2.1, 28S:18S \geq 1.8 : 1.0, 浓度 \geq 200 ng/ μ L。采用 qRT-PCR 技术定量分析 PCNA、Ccnd-2 和 Bcl-2 基因在不同培养条件下获得颗粒细胞中的表达水平。采用 Oligo 6.0 软件设计 qPCR 并合成引物(表 1)。分别采用 Prime ScriptTMRT 试剂盒和 SYBY Premix Ex Taq TM 试剂盒(TaKaRa, 日本)进行 cDNA 逆转录和 qPCR 反应, 所有操作严格按照试剂盒说明书于 IQ-5 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, 美国)上进行。qPCR 反应体系为 25 μ L, 包括 12.5 μ L SYBR Premix Ex Taq TM(2a)、1 μ L 上游引物、1 μ L 下游引物、2.0 μ L cDNA 模板和 8.5 μ L ddH₂O。反应程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min; 变性 95 $^{\circ}$ C 5 s, 退火 60 $^{\circ}$ C 20 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 15 s, 45 个循环, 延伸阶段收集荧光信号, 70~95 $^{\circ}$ C 绘制溶解曲线。采用 β actin 作为内参基因, 每组数据重复 3 次以上。

表 1 qPCR 引物
Table 1 Primers of qPCR

基因名 Gene name (GenBank ID)	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	大小/bp Size
Sheep PCNA(XM_004014340.4)	Forward: TCTCATGTCTCCTTGGTGCA Reverse: GCCAAGGTGTCCGCATTATC	173
Sheep Ccnd-2(100147799)	Forward: GACATTCAGCCCTACATGCG Reverse: AATGCACAACCTTCTCAGCGG	228
Sheep Bcl-2(AF164517.1)	Forward: TCTTTGAGTTCGGAGGGGTC Reverse: GGCCATACAGCTCCACAAAG	162
Sheep β actin(内参)(U39357.2)	Forward: CTGGACTTCGAGCAGGAGAT Reverse: TAGTTTCGTGAATGCCGCAG	172

1.3.6 Western blotting 法检测蛋白表达

准备进行 SDS-PAGE 的 5% 浓缩胶和 12% 分离胶。样品经缓冲液变性处理, 上样, 每孔 20 μ g。湿转膜法完成后经染色剂对膜进行染色并鉴定转膜效果。将转膜良好的膜完全浸没 5% 脱脂奶粉-TBST 液中, 室温轻摇封闭 30 min, 后用 5% 脱脂奶粉-TBST 按 1 : 1 000 稀释 p-AKT 和 p-FOXO1 抗体, 室温震荡 10 min, 充分混匀抗体, 置摇床震荡过

夜。第 2 天使用 TBST 洗膜 5 次, 每次 5 min, 用 5% 脱脂奶粉-TBST 按 1 : 1 000 稀释二抗 IgG, 室温轻摇 40 min, TBST 洗膜 6 次, 每次 5 min, ECL 孵育, 最后化学发光成像仪成像。

1.3.7 数据分析

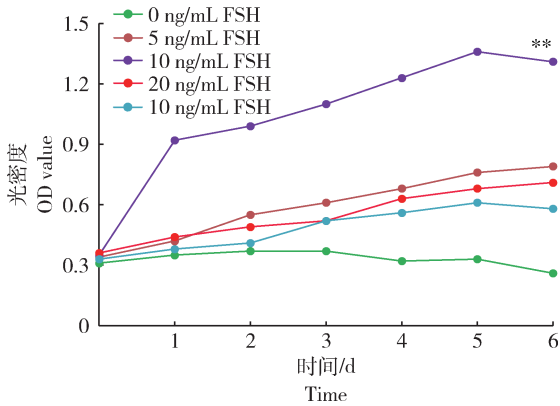
采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算 qRT-PCR 结果, 利用 SPASS 统计软件 T-test 进行差异显著性检验, 数据以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SEM) 表示。每组试验

数据重复至少3次。

2 结果与分析

2.1 FSH对GCs活性影响

在绵羊GCs培养基中添加浓度分别为0、5、10、20和40 ng/mL的FSH进行培养。每间隔1 d记录GCs增殖情况,接种当天记录0 d,及接种后1~6 d,结果见图1。10 ng/mL FSH培养GCs活性极显著高于其他处理组($P < 0.01$)。进一步证明FSH能显著提高GCs的增殖能力。



** 表示差异极显著 $P < 0.01$ 。

** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

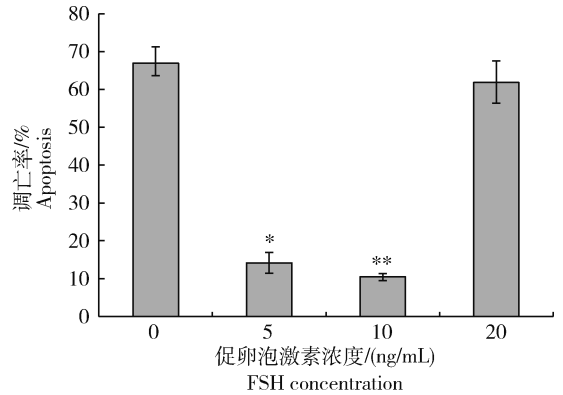
图1 不同浓度促卵泡素对体外颗粒细胞活性影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of FSH on the GCs viability *in vitro*

2.2 FSH对GCs凋亡影响

将GCs接种6孔板培养24 h后,利用Annexin V-FITC/PI荧光染色。采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,结果见图2:在10 ng/mL FSH培养下,

GCs凋亡率极显著低于其他浓度FSH培养的GCs ($P < 0.01$)。这一结果说明10 ng/mL FSH对绵羊GCs增殖有明显地促进作用,同时能显著抑制绵羊GCs凋亡。



* 表示差异显著 $P < 0.05$; ** 表示差异极显著 $P < 0.01$ 。

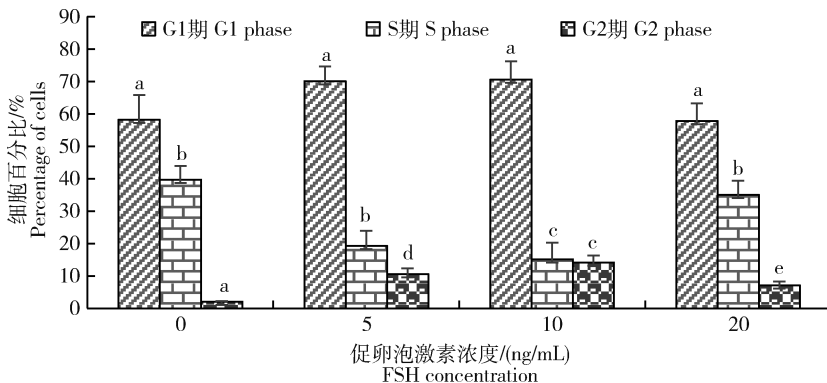
* indicates significant difference ($P < 0.05$). ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图2 不同浓度促卵泡素对体外颗粒细胞凋亡影响

Fig. 2 Effect of different concentrations FSH on the apoptosis of the GCs *in vitro*

2.3 FSH对GCs周期的影响

分别将不同浓度FSH添加培养基中培养GCs 24 h后,使用PI染色检测细胞周期。由图3可见:添加10 ng/mL FSH后,细胞从G1期到S期过渡时期,细胞增殖数量出现显著提高($P < 0.05$)。由于GCs增殖速度和数量发生变化主要发生于细胞周期G1到S阶段过渡中。这一过程主要受巢内分泌因子与调节因子之间的相互作用,用以调节卵泡颗粒细胞增殖和分化。



不同字母表示差异显著 $P < 0.05$ 。

Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

图3 不同浓度促卵泡素对体外绵羊颗粒细胞周期影响

Fig. 3 Effect of different concentrations FSH on the GCs cell cycle *in vitro*

2.4 抑制剂 AT7867 对 GCs 活性影响

使用 AKT/FOXO1 通路的抑制剂 AT7867 预处理 GCs, 根据抑制剂的不同浓度(0、5、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$)和不同时间(0、4、8、12、16、18、24、26 和 28 h)测定 GCs 活性。结果表明 10 $\mu\text{mol/L}$ AT7867 抑制剂孵育 24 h, GCs 活性极显著低于其他处理组($P < 0.01$) (图 4)。抑制剂 AT7867 可阻断 AKT 发生磷酸化, 进一步影响 AKT 信号通路下游靶基因 FOXO1 的转录水平, 最终阻滞 GCs 增殖分化功能。

2.5 FSH 通过 AKT/FOXO1 信号通路上调 PCNA、Ccmd-2 和 Bcl-2

组 1 是 GCs 仅用培养基 DMEM/F 12 为对照组, 组 2 为添加 10 ng/mL FSH, 组别 3 为添加 10 $\mu\text{mol/L}$ AT7867 抑制剂, 组别 4 是同时 10 ng/mL FSH 和 10 $\mu\text{mol/L}$ AT7867 抑制剂, 孵育 24 h 后,

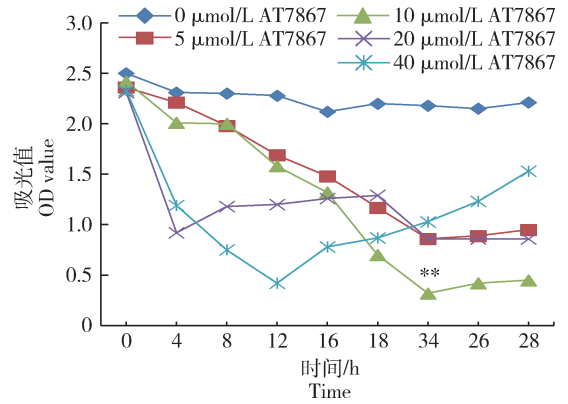
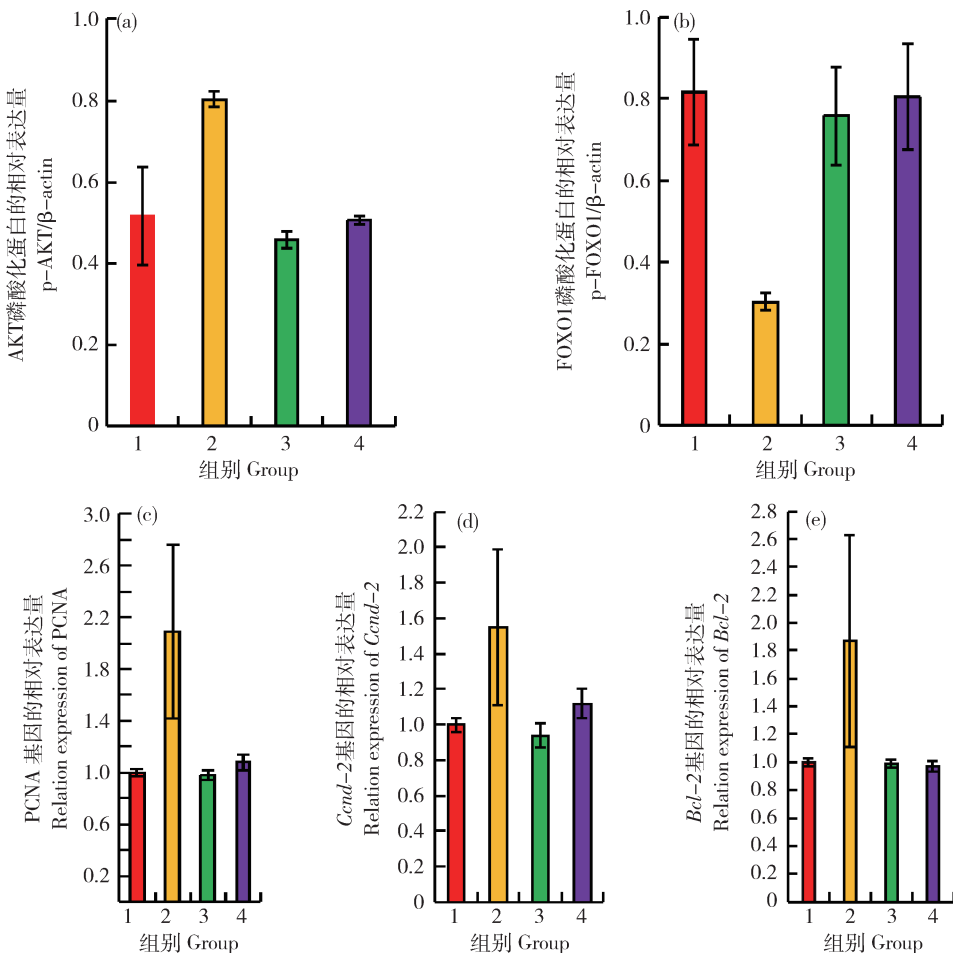


图 4 不同浓度抑制剂 AT7867 对体外颗粒细胞活性影响
Fig. 4 Effect of different concentrations inhibitor AT7867 on the GCs viability *in vitro*

通过 Wester-Blot 检测, 如图 5(a)~(b)所示, 与其他处理组相比, 10 ng/mL FSH(4(a2))显著提高 p-AKT(S473)蛋白的表达, 降低 p-FOXO1 蛋白水



1: 对照组; 2: 促卵泡素; 3 抑制剂 AT7867; 4: 促卵泡素加抑制剂. ** 表示差异极显著 $P < 0.01$ 。

1: Control; 2: FSH; 3: Inhibitor AT7867; 4: FSH+AT7867. ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 5 FSH 通过 AKT/FOXO1 通路上调靶基因

Fig. 5 FSH up-regulate targeted genes by AKT/FOXO1 pathway

平(4(b2)),同时上调绵羊 GCs 中 *PCNA*、*Ccnd-2* 和 *Bcl-2* 基因。如图 5(c)~(e)。*PCNA*、*Ccnd-2* 和 *Bcl-2* 是通过 AKT/FOXO1 信号通路参与细胞增殖,抑制细胞发生凋亡的生物学过程。

3 讨论与结论

哺乳动物卵巢卵泡的发育主要受垂体分泌的促性腺素调控。其中 FSH 是卵泡发育过程中形成优势卵泡的主导激素^[16]。FSH 通过靶器官细胞膜上的特异性受体 FSHR 介导,影响卵泡发育的成熟和卵泡数量。FSHR 主要表达卵巢卵泡 GCs,其表达水平与 GCs 存活、卵泡闭锁和卵母细胞成熟密切相关^[17]。本试验通过添加不同浓度 FSH 对绵羊 GCs 进行 24 h 培养后,检测其细胞活性和凋亡,发现 10 ng/mL FSH 对绵羊 GCs 增殖有明显的促进作用,同时能显著减少绵羊 GCs 凋亡(图 1 和图 2)。已有研究表明卵泡发育和闭锁调节是一个复杂的过程,涉及内分泌因子与卵巢调节因子之间的相互作用,从而控制卵泡细胞的命运(细胞增殖、分化和细胞程序性死亡)^[18]。本试验中添加 10 ng/mL FSH 处理 24 h 后,检测到细胞从 G1 期到 S 期,发现细胞增殖数量出现显著提高。这与已有研究报道 GCs 增殖速度和数量发生变化主要发生于细胞周期 G1 到 S 阶段过渡中的结果一致^[19-20]。

已有研究表明 FSH 下游的转录因子 *PCNA*、*Ccnd-2* 和 *Bcl-2* 的特异性表达水平,主要受 FOXO1 调控^[15-18];而 FOXO1 主要受 AKT 磷酸化调控,由 PI3K 途径激活,调节细胞周期、代谢或存活^[21-22]。其中:*PCNA* 是真核细胞 DNA 合成时所必需的一种细胞核蛋白,在细胞核内合成,并储存核内。*PCNA* 在细胞分裂期出现,其表达量的变化与 DNA 合成一致,与多种细胞周期调节因子和细胞增殖密切相关^[16]。而 *Ccnd-2* 是参与调控细胞周期中 G1 期向 S 期过渡的重要蛋白^[17]。*Bcl-2* 作为 G1/S 期过渡阶段的重要的调控蛋白,一方面能够促进细胞增殖,抑制细胞发生凋亡;另一方面可以调节细胞氧化还原状态(非蛋白巯基、谷胱甘肽),增强细胞抗氧化能力,减轻由氧化应激引起的细胞早期凋亡^[23]。

在大鼠 GCs 的试验中证实,抑制 FOXO1 磷酸化水平,能增强细胞中 *PCNA* 和 *Ccnd-2* 基因的特异性表达水平,进而阻滞细胞发生凋亡^[15]。进一步在大鼠肾小球系膜细胞的研究发现,FOXO1 过表

达会促使抗凋亡因子 *Bcl-2* 下调,导致细胞周期停滞,降低细胞增殖能力^[24]。阻断 AKT 下游的 FOXO1 蛋白质的磷酸化水平,则导致下游靶基因的功能发生改变^[25]

本研究结果表明:10 ng/mLFSH 处理能显著升高 GCs 中 p-AKT 蛋白水平和显著降低 p-FOXO1 的表达量,显著上调 *PCNA*、*CCnd-2* 和 *Bcl-2* 的转录水平;并能显著增强绵羊 GCs 活性和显著减少绵羊 GCs 凋亡。FSH 通过 AKT/FOXO1 信号通路调控靶基因 *PCNA*、*CCnd-2* 和 *Bcl-2* 转录水平,本研究可为进一步探明绵羊 GCs 功能的分子机制研究奠定基础。

参考文献 References

- [1] Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, Inoue N, Sakamaki K, Miyano T. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: Regulation of granulosa cell apoptosis during atresia [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2004, 50(5): 493-514
- [2] 乔竟谊,徐轲,孙青原. 卵泡发生与发育的调控[J]. 实用妇产科杂志, 2019, 35(5): 321-323
Qiao Y Y, Xu K, Sun Q Y. Regulation of follicular development and development [J]. *Journal of Applied Obstetrics and Gynecology*, 2019, 35 (5): 321-323 (in Chinese)
- [3] Shen M, Lin F, Zhang J, Tang Y, Chen W K, Liu H. Involvement of the up-regulated *FoxO1* expression in follicular granulosa cell apoptosis induced by oxidative stress [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(31): 25727-25740
- [4] Kreeger P K, Fernandes N N, Woodruff T K, Shea L D. Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional *in vitro* culture system is dependent on follicle stage and dose [J]. *Biology of Reproduction*, 2005, 73(5): 942-950
- [5] 汪立芹,何宗霖,林嘉鹏,吴阳升,黄俊成,萨福克羔羊卵泡诱导发育效果的研究[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(4): 141-146
Wang L Q, He Z L, Lin J P, Wu Y S, Huang J C. Study on follicle-induced development effect of Suffolk lamb [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2015, 20(4): 141-146 (in Chinese)
- [6] 李洁云. 热应激对小鼠卵巢卵泡闭锁和颗粒细胞凋亡的影响及其机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016
Li J Y. The mechanism of heat stress on follicular atresia and granulosa cell apoptosis in mouse ovary [D]. Beijing: China Agricultural University, 2016 (in Chinese)

- [7] Bancsi L F, Broekmans F J, Mol B W, Habbema J D, TeVelde E R. Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after *in vitro* fertilization: A meta-analysis [J]. *Fertility and Sterility*, 2003, 79(5): 1091-1100
- [8] Kaminski S L. Impact of environmental factors on ovarian function and endocrine activity in livestock[D]. Fargo: North Dakota State University, 2013
- [9] Hunzicker-Dunn M, Maizels E T. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression; Branching out from protein kinase A[J]. *Cell Signal*, 2006, 18(9): 1351-1359
- [10] Perez-Roger I, Kim S H, Griffiths B, Sewing A, Land H. Cyclins D1 and D2 mediate Myc-induced proliferation via sequestration of p27Kip1 and p21Cip1 [J]. *EMBO Journal*, 1999, 18(19): 5310-5320
- [11] El-Hefnawy T, Zeleznik A J. Synergism between FSH and activin in the regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cyclin D2 expression in rat granulosa cells[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(10): 4357-4362
- [12] Chowdhury I, Thompson W E, Welch C, Thomas K, Matthews R. Prohibitin (PHB) inhibits apoptosis in rat granulosa cells (GCs) through the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and the Bcl family of proteins [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(12): 1513-1525
- [13] Sanchez A M, Candau R B, Bernardi H. FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis[J]. *Cellular and Molecular Life Science*, 2014, 71(9): 1657-1671
- [14] Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(5): 329-341
- [15] Park Y, Maizels E T, Feiger Z J, Alam H, Peters C A, Woodruff T K, Unterman T G, Lee E J, Jameson J L, Hunzicker-Dunn M. Induction of cyclin D2 in rat granulosa cells requires FSH-dependent relief from FOXO1 repression coupled with positive signals from Smad [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(10): 9135-9148
- [16] Tse A C, Ge W. Spatial localization of EGF family ligands and receptors in the zebrafish ovarian follicle and their the expression profiles during folliculogenesis [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 167(3): 397-407
- [17] Regan S L, McFarlane J R, O'Shea T, Andronicos N, Arfuso F, Dharmarajan A, Almabbobi G. Flow cytometric analysis of FSHR, BMRRIB, LHR and apoptosis in granulosa cells and ovulation rate in Merino sheep[J]. *Reproduction*, 2015, 150(2): 151-163
- [18] Asselin E, Xiao C W, Wang Y F, Tsang B K. Mammalian follicular development and atresia: Role of apoptosis [J]. *Biological Signals and Receptors*, 2000, 9(2): 87-95
- [19] Golubev A. Transition probability in cell proliferation, stochasticity in cell differentiation, and the restriction point of the cell cycle in one package[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2012, 110(1): 87-96
- [20] Huang Y, Wu G, Fan H, Ye J, Liu X. Electroacupuncture promotes chondrocyte proliferation via accelerated G1/S transition in the cell cycle [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2013, 31(6): 1443-1448
- [21] Herndon M K, Law N C, Donaubaauer E M, Kyriss B, Hunzicker-Dunn M. Forkhead box O member FOXO1 regulates the majority of follicle-stimulating hormone responsive genes in ovarian granulosa cells[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016(434): 116-126
- [22] Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(5): 329-341.
- [23] Hsu S P, Lin P H, Chou C M, Lee W S. Progesterone up-regulates p27 through an increased binding of the progesterone receptor-A-p53 protein complex onto the non-canonical p53 binding motif in HUVEC [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2019(185): 163-171
- [24] Liu F, Ma X J, Wang Q Z, Zhao Y Y, Wu L N, Qin G J. The effect of FoxO1 on the proliferation of rat mesangial cells under high glucose conditions [J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2014, 29(10): 1879-1887
- [25] Han E K, Levenson J D, McGonigal T, Shah O J, Woods K W, Hunter T, Giranda V L, Luo Y. Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition[J]. *Oncogene*, 2007, 26(38): 5655-5661

责任编辑: 杨爱东