

接种密度对牛颗粒细胞形态及相关基因表达的影响

王栋梁¹, 成俊丽², 李鹏飞³

(1.朔州职业技术学院, 山西 朔州 036002; 2.山西农业大学 动物科学学院, 山西 太谷 030801;

3.山西农业大学 生命科学学院, 山西 太谷 030801)

摘要:牛卵巢颗粒细胞是雌激素(Estrogen, E₂)合成的主要来源,具有E₂活性的牛颗粒细胞体外模型的建立是研究E₂合成与分泌过程中潜在调控机制的重要工具,该细胞模型的建立可为E₂合成分子调控机制及牛卵巢卵泡发育机制的研究提供理论与技术支持。细胞接种密度是颗粒细胞体外培养模型的关键因素,高密度可引起细胞生理及分子的显著变化。研究通过不同接种密度下的形态变化和基因表达筛选牛颗粒细胞体外培养最优接种密度,采用长期无血清法培养牛原代颗粒细胞,培养液中添加FSH及IGF-1以诱导E₂的合成。培养7 d后,采集6孔板中高(3.0×10⁶个细胞/孔)、中(2.0×10⁶个细胞/孔)、低(1.0×10⁶个细胞/孔)3种不同接种密度的细胞图像进行观测,并利用qRT-PCR技术检测3种不同接种密度中相关基因的表达情况。结果表明,低密度(1.0×10⁶个细胞/孔)接种细胞呈现成纤维细胞样外观,细胞无聚集倾向;中密度组(2.0×10⁶个细胞/孔)可观察到少量聚集的细胞团;高密度(3.0×10⁶个细胞/孔)培养条件下,大多数细胞聚集成细胞团。低密度组(1.0×10⁶个细胞/孔)中,CYP19A1及FSHR高表达,RGS2及VNN2低表达;高密度组(3.0×10⁶个细胞/孔)表达量则相反。综上所述,低密度组(1.0×10⁶个细胞/孔)细胞可作为具有E₂活性的牛颗粒细胞体外模型。

关键词:牛;颗粒细胞;接种密度;无血清培养;细胞培养模型

中图分类号:S823.148

文献标识码:A

文章编号:1002-2481(2024)03-0147-06

Effects of Seeding Density on Morphology and Gene Expression of Bovine Granulosa Cells

WANG Dongliang¹, CHENG Junli², LI Pengfei³

(1. ShuoZhou Vocational Technology College, Shuozhou 036002, China; 2. College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 3. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Bovine granulosa cells(GCs) are the main source of estrogen(E₂) synthesis. The establishment of a bovine GCs model with E₂ activity *in vitro* is an important tool to study the potential regulatory mechanisms of E₂ synthesis and secretion, and the establishment of this cell model can provide theoretical and technical support for the study on the E₂ synthesis molecular regulation mechanism and bovine ovarian follicle development mechanism. Cell seeding density is the key factor of the GCs culture model *in vitro*, and high density can cause significant changes in cell physiology and molecules. In this study, the optimal seeding density of bovine GCs culture *in vitro* was screened by morphological changes and gene expression under different seeding densities. Primary bovine GCs were cultured by the long term serum-free method, FSH and IGF-1 were added in culture medium to induce synthesis of E₂. After 7 d of culture, images of cells with different seeding densities(low(1×10⁶ cells/well), medium(2×10⁶ cells/well), and high(3×10⁶ cells/well)) were collected for observation, and qRT-PCR was used to detect the expression of related genes in the three different seeding densities. The results showed that the low-density(1×10⁶ cells/well) inoculated cells showed a fibroblast-like appearance and no tendency for cell aggregation. A small number of aggregated cell clusters were observed in the medium-density group(2×10⁶ cells/well), and most of the cells were aggregated into cell clusters under high-density(3×10⁶ cells/well) culture conditions. In the low-density group(1×10⁶ cells/well), CYP19A1 and FSHR were highly expressed, RGS2 and VNN2 were lowly expressed, and the expression levels were opposite in the high-density group(3×10⁶ cells/well). In summary, the low-density group(1×10⁶ cells/well) of cells could be used as an *in vitro* model of bovine GCs with E₂ activity.

Key words: bovine; granulosa cell; seeding density; serum-free culture; cell culture model

收稿日期:2023-07-20

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31873002);山西省应用基础研究计划面上项目(20210302123380);山西农业大学横向科技项目(2022HX010,2021HX23,2020HX06,2019HX03)

作者简介:王栋梁(1982-),男,山西朔州人,讲师,硕士,主要从事动物生殖生理研究工作。

通信作者:李鹏飞(1978-),男,山西偏关人,教授,博士,主要从事动物生殖生理研究工作。

卵巢卵泡为雌性动物生殖的基本单位,每个卵泡由膜细胞、颗粒细胞及单个卵母细胞组成。卵泡发育依赖于颗粒细胞的分化与增殖,不同发育阶段的卵泡由不同激素发挥主要调节作用^[1]。牛属于单胎家畜,在一个发情周期内仅有一个卵泡排卵,低排卵率制约着超数排卵及胚胎移植等技术的发展,导致繁殖效率下降^[2]。卵泡发育过程及排卵的分子机制至今仍未完全了解,动物体内试验复杂昂贵,且不能研究卵泡发生过程中的特定分子机制,雌激素(Estrogen, E₂)在颗粒细胞增殖分化及卵泡发育过程中起主要调节作用,因此需构建具有 E₂活性的颗粒细胞体外培养模型来进行体外研究。

根据研究目的不同,颗粒细胞采用不同的培养方式。LERNER 等^[3]构建了牛颗粒细胞永生细胞系,该细胞系保留了原代培养的一些特征,如纤维连接蛋白生物合成的激素调节,但经过几次传代后,该细胞系丧失类固醇活性。在有血清条件下培养,颗粒细胞逐渐黄体化,由 E₂表型转变为孕激素(Progesterone, P)表型。在牛、绵羊等多个物种中,无血清条件下培养颗粒细胞可产生大量 E₂^[4-5]。颗粒细胞无血清体外培养模型的关键因素包括培养周期与细胞接种密度等。研究表明,在颗粒细胞原代培养的 4 d 内, E₂与 P 的分泌量极低,6 d 后显著增加,与具有 E₂活性的牛优势卵泡卵泡液的浓度相似,说明短期培养会失其 E₂活性,在长期培养条件下会部分恢复该功能^[6]。高接种密度会引起生理和分子特性的显著变化,部分基因以一种特定的方式被调节,类似于体内促黄体素(Luteinizing Hormone, LH)刺激引起的变化^[7]。BAUFELD 等^[8]对接种于 24 孔板中高(1.0×10⁶个细胞/孔)、低(1.0×10⁵个细胞/孔)2 种密度下培养的牛颗粒细胞进行转录组测序,结果表明,在高接种密度下,血管非炎症分子 2(Vascular Non-inflammatory Molecule 2, VNN2)、G 蛋白信号调节蛋白 2(Regulator of G Protein Signaling 2, RGS2)等黄体化标志基因表达上调;下调基因包括细胞色素 P450 芳香化酶家族 19 亚家族 A 肽 1(Cytochrome P450 Aromatase Family 19 Subfamily A member 1, CYP19A1)和促卵泡素受体(Follicle Stimulating Hormone Receptors, FSHR)等重要的卵泡发育关键基因。PORTELA 等^[9]研究发现,较低的颗粒细胞接种密度促进牛颗粒细胞 E₂分泌,有利于 E₂颗粒细胞表型,而较高的接种密度则抑制 E₂分泌、促进 P 分泌,有利于颗粒细胞黄体化。

本研究拟通过探究无血清条件下不同接种密度对牛颗粒细胞形态变化、卵泡发生过程关键基因及黄体化特异性标志基因的影响,从而选择牛原代颗粒细胞的合适接种密度,旨在为具有 E₂活性的牛颗粒细胞体外模型的建立及后续分子机制的研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试牛卵巢原代颗粒细胞采集于山西文水县肉牛屠宰场。

1.2 试验方法

1.2.1 牛卵巢采集与原代颗粒细胞分离 将正常发情母牛屠宰后取出双侧卵巢,置于加有青霉素、链霉素的 4 ℃ DPBS 中,在 2 h 内带回实验室。DPBS 洗涤卵巢,直至洗净表面血液,75% 酒精擦拭卵巢表面进行消毒,低温状态下分离卵巢表面的中小卵泡(直径小于 6 mm),置于 DPBS 中备用。将卵泡置于盛有培养基的培养皿中,超净台中剪开卵泡用细胞刮刀刮取颗粒细胞,收集带有颗粒细胞的培养基于离心管,1 000 r/min 离心 8 min 后弃去上清液,用 PBS 清洗细胞 2 次。

1.2.2 胶原蛋白包被培养皿 用无菌 0.36 g/L 乙酸将胶原蛋白稀释至 0.012 g/L,6 孔板(9.5 cm²/孔)每孔加入 1 580 μL,确保培养孔的整个表面都被胶原溶液覆盖,开盖在超净台过夜晾干,紫外照射 20 min 后,4 ℃ 保存。

1.2.3 颗粒细胞计数 培养基重悬细胞以制备细胞悬液,并将细胞稀释至适当浓度。细胞悬液与台盼蓝染色液(0.4%)以 9:1 比例混合,室温孵育 10 min。吸取 10 μL 染色后的细胞,使用 TC20 自动细胞计数器进行计数。活细胞比例为 50%~60%。

1.2.4 颗粒细胞无血清培养 按照不同接种量(1.0×10⁶个活细胞/孔、2.0×10⁶个活细胞/孔及 3.0×10⁶个活细胞/孔)将颗粒细胞接种于 6 孔板内,每孔加入 2 mL 无血清培养基。每组 3 个重复。无血清培养基由 MEM α 、0.84 g/L NaHCO₃、0.02 mol/L HEPES、1 g/L 牛血清白蛋白、10 μg/L 牛胰岛素、1 μg/L IGF-1、4 μg/L 亚硒酸钠、1 mmol/L NEAA、5 mg/L 转铁蛋白、2.0×10⁻⁶ mol/L 雄激素、100 IU/mL 青霉素、0.1 g/L 链霉素、250 g/mL 两性霉素 B、20 μg/L FSH 组成。原代颗粒细胞置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中进行培养,每隔 48 h 对

细胞形态进行观测并更换 2/3 新鲜培养基,以减轻细胞对新鲜培养基的应激。

1.2.5 qRT-PCR 检测相关基因的相对表达量 培养 7 d 后,用 PBS 清洗细胞,使用 TRIzol™ Reagent (Thermo, 美国)提取各组细胞总 RNA,取 1 μL RNA 样品经核酸蛋白测定仪检测其纯度及浓度,要求 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0。使用 gDNA Eraser 去除基因组 DNA,42 °C 反应 2 min;PrimeScript™

RT reagent Kit 试剂盒 (TaKaRa, 日本)合成 cDNA,37 °C/15 min,85 °C/5 s,4 °C/∞。使用 TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒 (TaKaRa, 日本)进行 qRT-PCR 检测,反应程序为:预变性 95 °C/30 s;PCR 反应 95 °C/5 s,60 °C/30 s,72 °C/20 s,40 个循环;溶解曲线阶段 95 °C/15 s,60 °C/60 s,95 °C/15 s^[10]。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列
Tab.1 The primer sequences of PCR

引物名称 Primer names	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	引物名称 Primer names	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
<i>β-actin</i> F	GGGACCTGACTGACTACCTC	<i>FSHR</i> R	CGCTTGGCTATCTTGGTGTCCAC
<i>β-actin</i> R	TCATACTCCTGCTTGCTGAT	<i>RGS2</i> F	AGTGCTCTGTTCTTGGCTGTC
<i>CYP19A1</i> F	GTCGTCCTGGTCACCCCTTCTG	<i>RGS2</i> R	TCTCGCTTCTCCTCGTTCTTGG
<i>CYP19A1</i> R	GGTCTCTGGTCTCGTCTGGATG	<i>VNN2</i> F	GTACGCCAAGGACGCACATTC
<i>FSHR</i> F	TGTGGTCATCTGTGGCTGCTAC	<i>VNN2</i> R	CACAGCATCCCGCAAGGTTATG

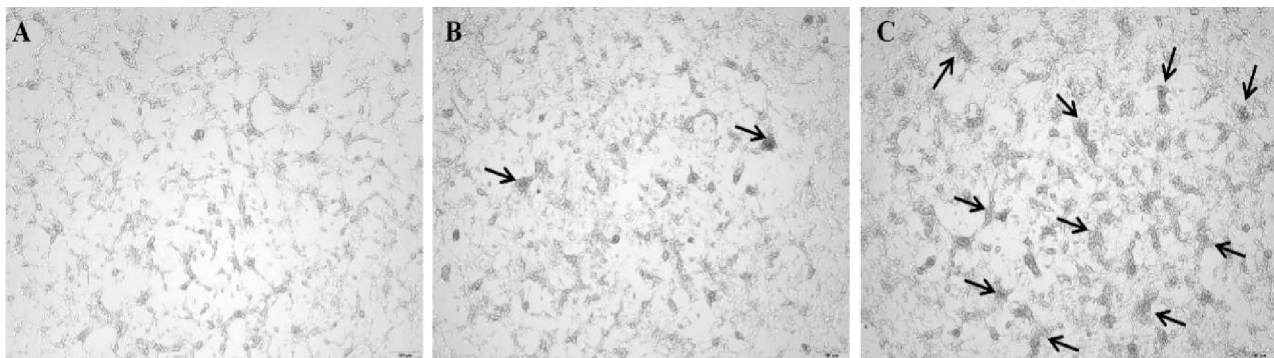
1.3 数据分析

以 *β-actin* 作为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt} 值计算基因的相对表达情况;使用 GraphPad Prism 8.0.2 统计软件对试验数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同接种密度下颗粒细胞形态变化

对采集培养 7 d 后的颗粒细胞图像进行观测,结果如图 1 所示。



A. 低密度(1.0×10⁶个细胞/孔);B. 中密度(2.0×10⁶个细胞/孔);C. 高密度(3.0×10⁶个细胞/孔);→表示聚集的细胞团
A. Low density(1.0×10⁶ cells/well); B. Medium density(2.0×10⁶ cells/well); C. High density(3.0×10⁶ cells/well); → Indicated clustered cell clusters

图 1 不同接种密度下的牛颗粒细胞形态
Fig.1 Morphology of bovine granulosa cells with different seeding densities

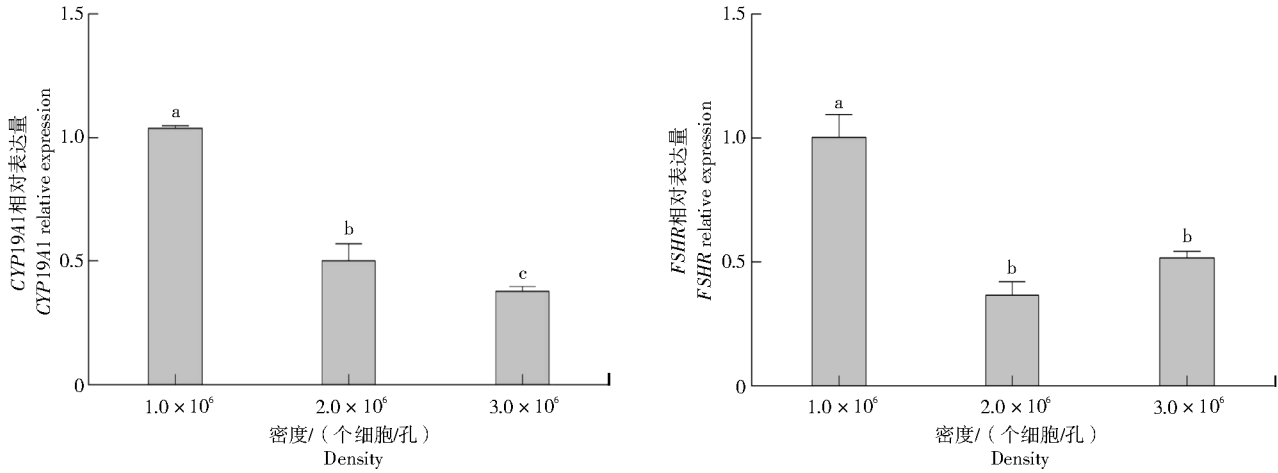
低密度接种细胞(1.0×10⁶个细胞/孔)呈现出典型的成纤维细胞样外观,细胞边缘延伸,无聚集倾向(图 1-A);当细胞密度增加至 2.0×10⁶个细胞/孔时,细胞形态未改变,可观察到少量聚集的细胞团(图 1-B);高密度(3.0×10⁶个细胞/孔)培养条件下,大多数细胞聚集成细胞团(图 1-C)。

2.2 卵泡发生关键基因在不同接种密度颗粒细胞中的表达分析

颗粒细胞无血清条件下培养 7 d 后,利用 qRT-PCR 技术检测卵泡发生关键基因 *CYP19A1* 及

FSHR 在低、中、高接种密度中的相对表达量,结果如图 2 所示,*CYP19A1* 在低接种密度中相对表达量显著高于中、高密度组($P < 0.05$);在中接种密度中也显著高于高密度组($P < 0.05$)。*FSHR* 在低接种密度中相对表达量显著高于中、高密度组($P < 0.05$),在中接种密度中相对表达量与高密度组间差异不显著($P > 0.05$)。结果表明,*CYP19A1* 在低密度培养条件下表达量最高,且随着接种密度的增加 *CYP19A1* 的表达量逐渐下降。*FSHR* 同样在低密度接种情况下表达量最高,中密度接种时降

低,随着密度进一步增加,表达量不再发生显著变化。



不同小写字母表示 $P < 0.05$ 的显著性差异水平。下同

Different lowercase letters indicated significant differences at the level of 0.05. The same as below

图2 CYP19A1及FSHR在细胞不同接种密度中的相对表达量
Fig.2 Relative expression of CYP19A1 and FSHR in different cell seeding densities

2.3 黄体化特异性标志基因在不同接种密度颗粒细胞中的表达分析

无血清状态培养颗粒细胞 7 d 后,利用 qRT-PCR 技术检测黄体化特异性标志基因 *RGS2* 及 *VNN2* 在不同接种密度中的相对表达量,结果如图 3 所示,*RGS2* 在低、中接种密度中相对表达量显著低于高密度 ($P < 0.05$),但在低、中接种密度中的表

达无显著差异 ($P > 0.05$)。 *VNN2* 在低接种密度中相对表达量显著低于中、高密度组 ($P < 0.05$);在中接种密度中相对表达量也显著低于高密度组 ($P < 0.05$)。结果表明,*RGS2* 在低、中接种密度中表达量较低,在高密度中表达量增高。*VNN2* 在低密度培养条件下表达量最低,且随着接种密度的增加表达量逐渐升高。

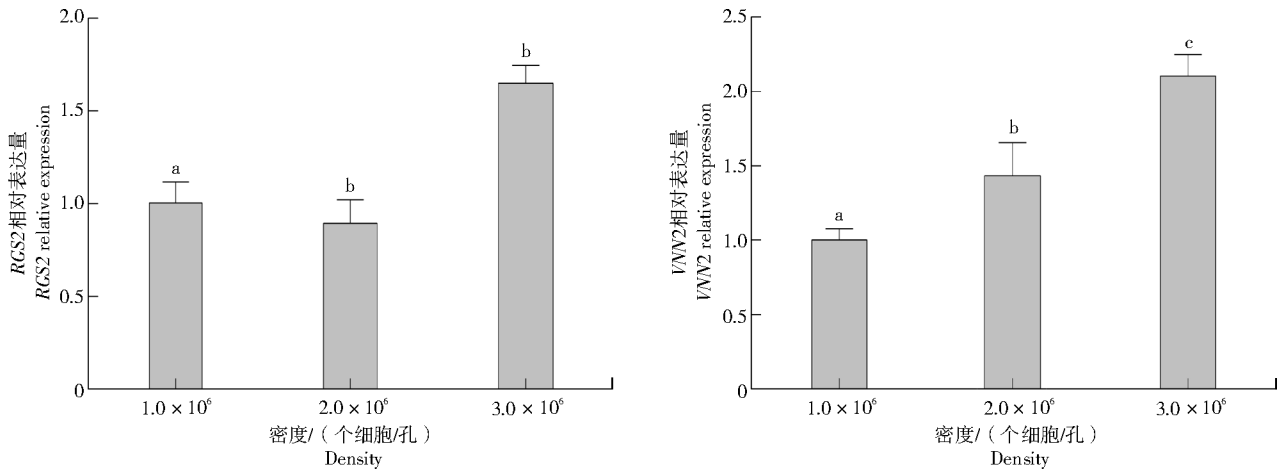


图3 RGS2及VNN2在细胞不同接种密度中的相对表达量
Fig.3 Relative expression of RGS2 and VNN2 in different cell seeding densities

3 结论与讨论

卵泡颗粒细胞能够与膜细胞相互作用分泌多种激素和因子,同时可促进卵母细胞的发育与成熟,在整个卵泡发育阶段起着关键作用^[11]。此外,颗粒细胞是哺乳动物 E_2 的主要来源, E_2 能够促进卵泡发育成熟,调节雌性生殖过程中多种生理过

程^[12]。卵泡发育初期体积较小,颗粒细胞分泌大量 E_2 促进自身增殖,随着颗粒细胞数量增多,卵泡体积变大到达发育末期,颗粒细胞转而分泌 P,导致 E_2 与 P 比例骤变,为排卵做准备^[13-14]。低密度接种模拟卵泡发育早期,具有细胞数目少,主要激素为 E_2 等特点,增加接种密度会驱使细胞进入早期排卵前阶段。本研究对低、中、高 3 种不同接种密度的

牛颗粒细胞进行细胞形态观察,结果表明,3种接种密度中颗粒细胞增生均不明显,这与前人研究一致,无血清培养体系可维持颗粒细胞E₂大量分泌,有血清培养可促进颗粒细胞增殖^[15]。BAUFELD等^[16]研究发现,低密度组(1.0×10⁵个细胞/孔)颗粒细胞显示出典型的成纤维细胞样外观,倾向于形成团;将接种密度增加至1.0×10⁶个细胞/孔,细胞形态未发生改变,但可以观察到更多的细胞团。本研究结果类似,低密度组细胞边缘延伸,未有聚集倾向,而高密度组形成了更多的细胞团,颗粒细胞有聚集生长的特性,当接种的细胞数量增多,会更倾向于形成团块。这与卵泡接近排卵期,颗粒细胞密度增加,发生聚集,细胞黄体化表型相似。

颗粒细胞标志基因的表达情况间接反映细胞所处的发育阶段。*CYP19A1*、*FSHR*在卵泡发育阶段高表达,随着颗粒细胞逐渐黄体化,*RGS2*、*VNN2*等黄体标志基因表达逐渐升高。E₂合成途径的抑制和P生成途径的增加导致E₂:P值降低,这由E₂合成酶的mRNA丰度决定,E₂分泌的减少也与编码*FSHR*的mRNA丰度减少有关^[9]。*CYP19A1*编码的芳香化酶是E₂合成通路中的关键限速酶,*CYP19A1*基因敲除小鼠模型E₂合成受限,缺乏黄体生成,导致小鼠不孕^[17]。*FSHR*介导FSH功能,在生殖调控中起着核心作用^[18]。FSH与*FSHR*结合后,激活腺苷酸环化酶(Ac)及糖原磷酸化酶(Gs),使胞内cAMP升高,从而调控下游基因的表达。卵巢中*FSHR*的表达量与产子数呈正相关,*FSHR*基因的低表达会影响卵巢对FSH信号的应答,从而使其不孕^[19]。在本研究中,低密度组*CYP19A1*表达量最高,且随着接种密度的增加表达量逐渐下降;*FSHR*也同样在低密度组中表达量最高。此结果说明,低密度组可作为研究E₂合成与分泌的牛颗粒细胞体外模型。LH激增诱导多种细胞内信号通路的激活,以调节卵泡内排卵所需基因的表达,这一过程具有多种急性炎症反应的特征,包括充血、水肿、白细胞浸润及诱导蛋白和胶原溶解^[20]。*VNN2*与白细胞粘附和向炎症部位的迁移有关,且在牛排卵卵泡中高表达。SAYASITH等^[21]研究表明,*VNN2*可能在排卵过程中发挥作用,排卵前促性腺激素依赖性的*VNN2*上调可能表明其参与白细胞进入卵泡的募集,从而帮助传播局部炎症反应,并参与卵泡破裂所必需的细胞外基质的降解。*VNN2*还可能参与调节ROS的生理水平,从而保护卵泡细胞免受氧化损伤,防止卵泡早破。*RGS2*

参与调节排卵过程中G蛋白的激活。在体外原代培养的牛颗粒细胞中,排卵前卵泡出现促性腺激素依赖性的*RGS2*上调^[22]。SAYASITH等^[23]研究表明,牛颗粒细胞中forskolin激活牛*RGS2*启动子依赖于反式激活CREB1和ETS1蛋白,它们分别与共识的CRE和ETS1顺式作用元件相互作用。牛*RGS2*启动子活性和转录本在颗粒细胞中的表达上调涉及多种信号通路,包括PKA、ERK1/2和EGFR。本研究结果表明,*VNN2*在低密度组中表达量最低,随着密度的增加,表达量逐渐增高。*RGS2*在高密度组中表达量最高。高密度组中*VNN2*及*RGS2*的高表达与体内早期黄体化基因表达情况相似,暗示高密度条件诱导的颗粒细胞模型可能成为牛排卵前卵泡的体外模型。

综上所述,本研究通过对不同接种密度的颗粒细胞进行形态观测及关键基因表达分析发现,高密度组中,颗粒细胞大量聚集,形成细胞团,且黄体化特异性标志基因*VNN2*及*RGS2*在高密度组中表达量最高,这提示该组可作为排卵前卵泡颗粒细胞体外模型。低密度组中,颗粒细胞无聚集倾向,卵泡发生关键基因*CYP19A1*及*FSHR*表达量最高,可为E₂合成与分泌相关机制的研究提供颗粒细胞体外模型。

参考文献:

- [1] LIU Y X, ZHANG Y, LI Y Y, et al. Regulation of follicular development and differentiation by intra-ovarian factors and endocrine hormones[J]. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 2019, 24(5): 983-993.
- [2] 李鹏飞, 吕丽华. 牛发情周期卵泡发育及其研究方法进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(3): 333-339.
LI P F, LV L H. Turnover of bovine follicle in the estrous cycle and research techniques in progress[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2013, 44(3): 333-339.
- [3] LERNER A A, SALAMONE D F, CHIAPPE M E, et al. Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: protein secretion, steroid metabolism, and responsiveness to growth factors[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1995, 164(2): 395-403.
- [4] STEWART D R, VANDEVOORT C A. Simulation of human luteal endocrine function with granulosa lutein cell culture[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1997, 82(9): 3078-3083.
- [5] COTTERILL M, CATT S L, PICTON H M. Characterisation of the cellular and molecular responses of ovine oocytes and their supporting somatic cells to pre-ovulatory levels of LH and FSH during *in vitro* maturation[J]. *Reproduction*, 2012, 144(2): 195-207.
- [6] YENUGANTI V R, VANSELOW J. Cultured bovine granu-

- losa cells rapidly lose important features of their identity and functionality but partially recover under long-term culture conditions[J]. *Cell and Tissue Research*, 2017, 368(2):397-403.
- [7] ROBKER R L, RICHARDS J S. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1[J]. *Molecular Endocrinology*, 1998, 12(7):924-940.
- [8] BAUFELD A, KOCZAN D, VANSELOW J. Induction of altered gene expression profiles in cultured bovine granulosa cells at high cell density[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2017, 15(1):3.
- [9] PORTELA V M, ZAMBERLAM G, PRICE C A. Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells[J]. *Fertility and Sterility*, 2010, 93(6):2050-2055.
- [10] 韩雨晴, 薄素雪, 严飞飞, 等. 不同品种猪 *PVALB* 基因多态性及其在肌肉组织的表达差异分析[J]. *河南农业科学*, 2023, 52(5):150-155.
- HAN Y Q, BO S X, YAN F F, et al. Analysis of porcine *PVALB* gene polymorphism and differential expression in muscle tissues of different pig breeds[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2023, 52(5):150-155.
- [11] 马晓燕, 郭翔宇, 贾凯琪, 等. bta-miR-1343-3p 靶向 *NEDD8* 调控牛卵泡颗粒细胞增殖与凋亡机制初探[J]. *山西农业科学*, 2023, 51(2):198-205.
- MA X Y, GUO X Y, JIA K Q, et al. Preliminary study on mechanism of bta-miR-1343-3p targeting *NEDD8* regulating cell proliferation and apoptosis of bovine granulosa cells[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2023, 51(2):198-205.
- [12] 王晓雪, 刘晰梦, 方振宇, 等. 猪卵巢颗粒细胞和黄体细胞凋亡的调控机制研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2023, 59(9):93-97.
- WANG X X, LIU X M, FANG Z Y, et al. Advances in regulatory mechanism of apoptosis in porcine ovarian granulosa cells and luteal cells[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2023, 59(9):93-97.
- [13] FORTUNE J E, YANG M Y, MURUVI W. *In vitro* and *in vivo* regulation of follicular formation and activation in cattle[J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2011, 23(1):15-22.
- [14] 徐保阳, 秦文峡, 晏向华. 母猪卵泡发育质量的营养调控研究进展[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(10):6334-6342.
- XU B Y, QIN W X, YAN X H. Advances in nutritional regulation of follicular development quality of sows[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(10):6334-6342.
- [15] 王春强, 马巍, 马宁. 不同培养体系对绵羊颗粒细胞增殖及 *CYP19* 基因 mRNA 表达的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2013, 49(15):33-36.
- WANG C Q, MA W, MA N. Effects of different culture systems on the proliferation of sheep granulosa cells and the mRNA expression of *CYP19* gene[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2013, 49(15):33-36.
- [16] BAUFELD A, VANSELOW J. A tissue culture model of estrogen-producing primary bovine granulosa cells[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(139):58208.
- [17] BRITT K L, DRUMMOND A E, COX V A, et al. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the *Cyp 19*(aromatase) gene[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(7):2614-2623.
- [18] 神英超, 陶力, 任宏, 等. 卵母细胞成熟相关激素和生长因子受体在马扩展型和紧凑型卵丘-卵母细胞复合体表达的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(9):3735-3744.
- SHEN Y C, TAO L REN H, et al. Differential expression of oocyte development-related hormone and growth factor receptors in equine expanded and compact cumulus-oocyte complexes[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(9):3735-3744.
- [19] BANERJEE A A, ACHREKAR S K, JOSEPH S, et al. Functional characterization of two naturally occurring mutations V²²¹G and T⁴⁴⁹N in the follicle stimulating hormone receptor[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 440:69-79.
- [20] DUFFY D M, KO C, JO M, et al. Ovulation: parallels with inflammatory processes[J]. *Endocrine Reviews*, 2019, 40(2):369-416.
- [21] SAYASITH K, SIROIS J, LUSSIER J G. Expression, regulation, and promoter activation of vanin-2(VNN2) in bovine follicles prior to ovulation[J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 89(4):1-11.
- [22] WU Y L, CHUANG H H, KOU Y R, et al. Regulation of LH receptor and PGF2alpha receptor signaling by the regulator of G protein signaling 2(RGS2) in human and mouse granulosa cells[J]. *The Chinese Journal of Physiology*, 2008, 51(5):282-291.
- [23] SAYASITH K, SIROIS J, LUSSIER J G. Expression and regulation of regulator of G-protein signaling protein-2(RGS2) in equine and bovine follicles prior to ovulation: molecular characterization of RGS2 transactivation in bovine granulosa cells[J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 91(6):1-12.