

·临床研究·

GDF9 和 BMP15 在未刺激多囊卵巢综合征卵巢组织中的异常表达

魏莉娜, 李俐琳, 方丛, 黄睿, 梁晓燕*
(中山大学附属第六医院生殖中心, 广东 广州 510655)

摘要: 【目的】检测未经过促排卵刺激的 PCOS 患者和正常排卵妇女卵巢组织中 GDF9 和 BMP15 的蛋白表达水平以及比较两组之间的表达差异。【方法】收集未经过卵巢刺激的 PCOS 患者(PCOS 组)和正常排卵妇女(对照组)的卵巢组织, 采用免疫组织化学染色的方法检测卵母细胞和颗粒细胞中 GDF9 和 BMP15 的蛋白表达水平。【结果】GDF9 和 BMP15 蛋白在未刺激卵母细胞和颗粒细胞中均有表达, 并且呈现阶段依赖性。GDF9 蛋白在 PCOS 早期卵泡卵母细胞和颗粒细胞中的表达水平均低于对照组并且表达滞后($P < 0.05$), BMP15 蛋白在 PCOS 早期卵泡的颗粒细胞中也存在表达水平降低和滞后现象($P < 0.05$), 但是在 PCOS 卵母细胞中的表达与对照组没有差异($P > 0.05$)。【结论】GDF9 和 BMP15 蛋白在未刺激卵母细胞和颗粒细胞中均呈现阶段依赖性表达; 两种因子在 PCOS 早期卵泡阶段存在表达水平降低并且滞后现象, 提示可能与 PCOS 卵泡发育紊乱有关。

关键词: 生长分化因子 9; 骨形成蛋白 15; 多囊卵巢综合征

中图分类号: R715 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2014)01-0054-07

Abnormal Expression of GDF9 and BMP15 in Unstimulated Ovarian Tissue in Patients with PCOS

WEI Li-na, LI Li-lin, FANG Cong, HUANG Rui, LIANG Xiao-yan*

(Reproductive Medicine Research Center, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510655, China)

Abstract: 【Objective】 To determine the expression levels of GDF9 and BMP15 in unstimulated ovarian tissues from PCOS patients and normal ovulatory women, and compare the differences between the two groups. 【Methods】 The unstimulated ovarian tissues were collected from PCOS patients and normal ovulatory women. Immunohistochemical staining was used to detect the expression levels of GDF9 and BMP15 both in oocytes and granulosa cells within the tissues. 【Results】 Both the GDF9 and BMP15 were stage dependently expressed in oocytes and granulosa cells within the ovarian tissues. The expression of GDF9 was lower and delayed in oocytes and granulosa cells of PCOS tissues than in control group ($P < 0.05$), the similar result was obtained for BMP15 in granulosa cell of PCOS tissues ($P < 0.05$). However, the expression of BMP15 was comparable in PCOS oocyte and normal control ($P > 0.05$). 【Conclusion】 The expression features of GDF9 and BMP15 demonstrate the stage-dependent characteristic both in oocytes and granulosa cells without ovarian stimulation. The expression of two factors was reduced and delayed in the early follicular phase in PCOS tissues, suggesting that might be associated with aberrant PCOS follicular development.

Key words: growth differentiation factor 9; bone morphogenetic protein 15; polycystic ovary syndrome

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(1): 54-60]

收稿日期: 2013-07-22

基金项目: 国家自然科学基金(81200476); 教育部博士点基金(20090171110059; 20120171120122); 广东省自然科学基金(S2012040007770; S2011010004621); 广东省医学科研基金(B2012150)

作者简介: 魏莉娜, 博士, 助理研究员; 研究方向为卵子和胚胎发育及多囊卵巢综合征的病理机制, E-mail: weilinaly@126.com; * 通信作者: 梁晓燕, 博士, 教授

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种常见的生殖内分泌疾病, 并且常伴随生殖系统肿瘤、代谢综合征和精神症状等远期并发症, 严重影响女性生殖健康和生活质量^[1]。然而迄今为止, 其病因和病理机制尚未完全清楚。研究发现 PCOS 患者存在卵泡发育紊乱, 并且可能与卵巢内部旁分泌和自分泌因子的异常表达有关, 其中卵源性因子 (oocyte secreted factors, OSFs) 如生长分化因子 9 (growth differentiation factor 9, GDF9) 和骨形成蛋白 15 (bone morphogenetic protein 15, BMP15) 与 PCOS 卵泡发育紊乱的关系十分密切^[2]。GDF9 和 BMP15 同属于转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β) 超家族, 在卵泡发育和卵母细胞成熟过程中都发挥重要的调节作用^[3]。研究发现两者可促进原始卵泡和初级卵泡的形成, 并促进始基卵泡生长至次级卵泡, 还可促进窦前卵泡到窦卵泡的转变, 对卵丘膨胀也具有不可替代的作用^[4-7]。利用 GDF9 或 BMP15 的抗体中和实验发现, 两者不仅可以调节卵泡形成, 还参与了排卵的调控^[8], 且对黄体的形成及功能也可能具有调节作用^[9]。可见 GDF9 和 BMP15 参与了卵泡发育的整个过程, 共同促进卵泡的发育成熟及排卵。因此, 本研究拟检测未经过卵巢刺激的 PCOS 卵巢组织和正常卵巢组织中 GDF9 和 BMP15 的蛋白表达水平, 并比较两组之间卵源性因子表达的差异, 进一步探讨 PCOS 卵泡发育紊乱的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 病例选择及材料来源

本研究方案经过中山大学附属第六医院伦理委员会批准, 所有患者均签署知情同意书。本研究收集从 2010 年 5 月至 2011 年 6 月在本院行卵巢组织活检的 PCOS 患者和正常排卵妇女的卵巢组织, 分为 PCOS 组 (15 例) 和对照组 (18 例)。对照组卵巢组织来源于临床诊断为子宫内膜癌或子宫颈癌需要进行卵巢活检以排除卵巢是否被肿瘤侵犯的患者, 必须是无肿瘤侵犯的正常卵巢组织才能用于本研究。

PCOS 的诊断依据为 2003 年鹿特丹标准^[10], 正常排卵妇女的入选标准为: 月经规律 (月经周期为 21 ~ 35 d), 基础体温测试证实有正常排卵, 超

声证实卵巢形态正常, 在月经周期的第 3 ~ 5 天抽血检查雄激素水平正常 ($<0.6 \mu\text{g/L}$), 且基础卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) $<10 \text{ U/L}$, 体质量指数 (body mass index, BMI) 在 $18.5 \sim 23.0 \text{ kg/cm}^2$ 范围之内。所有病例的排除标准为: 合并卵巢早衰、子宫内膜异位症、高泌乳素血症、甲状腺功能异常者; 曾接受过卵巢手术或放化疗者; 近 3 个月内接受过促排卵治疗或服用性激素者。

1.2 免疫组织化学染色

卵巢组织用 100 mL/L 甲醛溶液固定用于免疫组织化学检测。将卵巢组织连续切片厚度为 $5 \mu\text{m}$, 脱蜡, 脱水, 置于 0.01 mol/L 柠檬酸溶液 (pH 6.0) 高压蒸汽 3 min 修复抗原。分别将组织切片与 GDF9 一抗 (Abcam, UK) 1:40 或 BMP15 一抗 (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:40, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。PBS 洗涤 3 遍, 再与二抗 (Santa Cruz Biotechnology, USA, 1:200) 室温孵育 30 min。PBS 洗涤 3 遍, 用 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色。实验均设立阴性对照和空白对照。染色后的切片背景为紫蓝色, 阳性表达为黄色或棕褐色, 每张切片均由 2 名经验丰富的技术人员共同判断。信号强度分为 4 级: 阴性 (-): 蓝色背景上没有黄色信号; 弱阳性 (+): 细胞内有浅黄色颗粒, 但稀疏分布, 阳性细胞的比例 $<25\%$; 中等阳性 (++) : 细胞内有黄色颗粒且分布较密, 阳性细胞的比例在 $25\% \sim 50\%$; 强阳性 (+++) : 细胞内有深黄色或黄褐色颗粒且部分堆积, 阳性细胞的比例 $>50\%$ 。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计包 (SPSS Inc., Chicago, USA) 进行分析, 统计方法包括 t 检验和卡方检验。设定 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者基本信息的比较

本研究中 PCOS 组和对照组患者的基本信息均无差异 (表 1)。GDF9 和 BMP15 蛋白分布于卵母细胞和颗粒细胞的胞浆 (图 1)。

2.2 GDF9 在对照组和 PCOS 组卵母细胞的表达及其差异

在对照组卵母细胞中, GDF9 蛋白从始基卵泡开始表达, 但表达强度不高, 随着卵泡发育逐渐增强, 至 Graafian 卵泡时呈现高强度表达信号。而在

表 1 两组患者基本信息的比较

General indicators	Comparison of general conditions between two groups		P value
	Control	PCOS	
No. of cases	18	15	
Age/years	30.33 ± 2.92	31.07 ± 3.13	> 0.05
BMI/(kg/m ²)	20.70 ± 2.00	21.38 ± 1.32	> 0.05
FSH/(U/L)	5.36 ± 1.40	4.41 ± 1.15	> 0.05
LH/(U/L)	3.65 ± 2.93	6.13 ± 3.96	> 0.05
PRL/(μg/L)	19.05 ± 8.92	17.80 ± 5.94	> 0.05
E ₂ /(ng/mL)	36.22 ± 17.36	40.03 ± 19.98	> 0.05
T/(nmol/L)	0.69 ± 0.27	0.94 ± 0.40	> 0.05

The data were expressed as the mean ± SD, and Student's *t*-test was used for comparisons between two groups

PCOS组卵母细胞中,虽然 GDF9 的蛋白在始基卵泡也开始表达,但仍有 37%的卵母细胞显示为阴性信号,之后随着卵泡发育 GDF9 的表达有增高的趋势,至 Graafian 卵泡时也呈现较高表达。

在始基卵泡和初级卵泡的卵母细胞中,GDF9

阳性表达率在 PCOS 组都显著低于对照组,差异有统计学意义(P 值分别为 $P < 0.01, P < 0.05$);在次级卵泡阶段,PCOS 组卵母细胞的阳性表达率也有低于对照组的趋势,但差异没有统计学意义($P > 0.05$);在 Graafian 卵泡,未发现两组卵母细胞的表达强度存在差异。但是 PCOS 组和对照组的 Graafian 卵泡总数均较少,未能进行统计学分析。总结 GDF9 在 PCOS 组和对照组卵母细胞中的表达差异可以发现,PCOS 组卵母细胞的表达存在滞后现象;并且在相同的卵泡发育阶段,PCOS 组卵母细胞的表达强度较低(表 2)。

2.3 GDF9 在对照组和 PCOS 组颗粒细胞的表达及其差异

在对照组颗粒细胞中,48%的始基卵泡表达 GDF9 阳性信号,但表达强度不高,之后随着卵泡发育逐渐增强,至 Graafian 卵泡时呈现高强度表达信号。而在 PCOS 组颗粒细胞中,只有 18%的始基卵泡显示为阳性信号,之后随着卵泡发育 GDF9 的表达也有增高的趋势,至 Graafian 卵泡时呈现

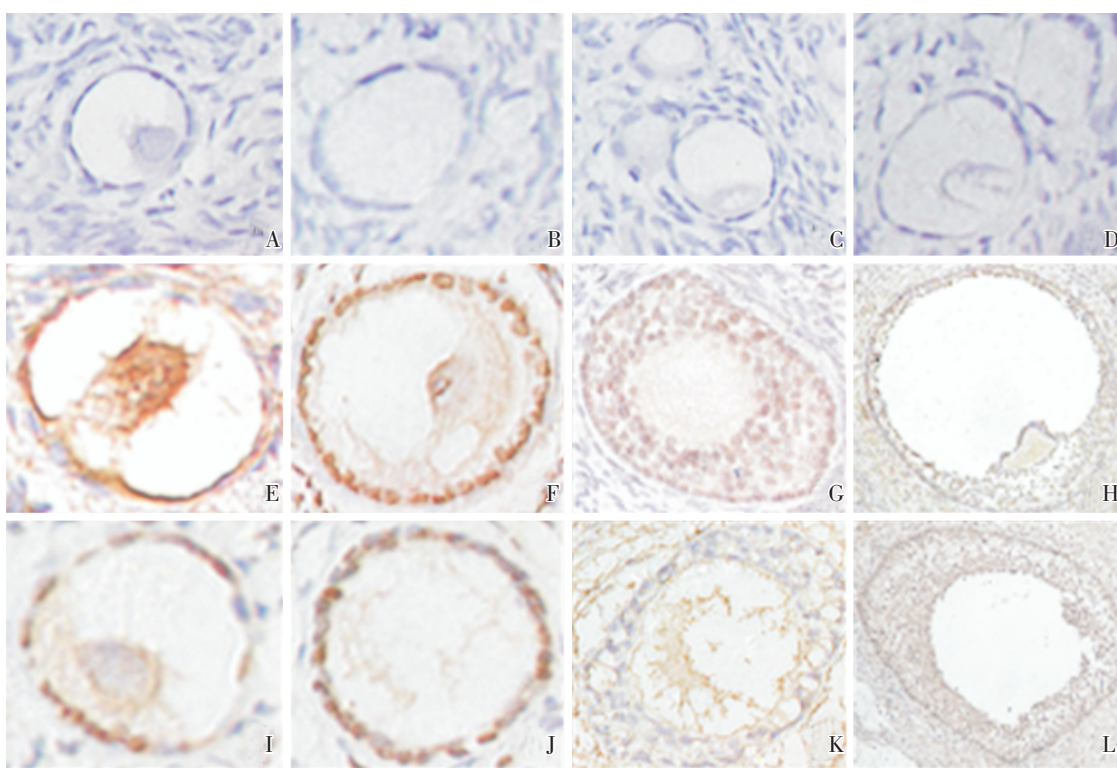


图 1 卵源性因子在正常和 PCOS 卵巢组织中的表达

Fig.1 Expression of GDF9 and BMP15 proteins in normal and PCOS ovarian tissues

A and B: Negative control for GDF9 and BMP15 proteins in normal ovarian tissues; C and D: Negative control for GDF9 and BMP15 proteins in PCOS ovarian tissues; E, F, G, H: GDF9 protein located in the primordial, primary, secondary and Graafian follicles of the normal ovarian tissues; I, J, K, L: GDF9 protein located in the primordial, primary, secondary and Graafian follicles of PCOS ovarian tissues.

较高表达。颗粒细胞中 GDF9 的表达规律与卵母细胞极其相似。

在始基卵泡的颗粒细胞中, GDF9 的阳性表达率在 PCOS 组显著低于对照组 ($P < 0.001$); 在初级和次级卵泡阶段, PCOS 组颗粒细胞的阳性表达率也较低, 但差异没有统计学意义 (P 值分别为 0.24 和 0.22); 在 Graafian 卵泡, 未发现两组颗粒细胞的表达强度存在差异。但是 PCOS 组和对照组的 Graafian 卵泡总数均较少, 未能进行统计学分析。概括 GDF9 在 PCOS 组和对照组颗粒细胞中的表达差异可以发现, PCOS 组颗粒细胞的表达在小窦卵泡才达到对照组初级卵泡的表达水平, 提示表达滞后(表 3)。

2.4 BMP15 在对照组和 PCOS 组卵母细胞的表达及其差异

在对照组和 PCOS 组卵母细胞中, BMP15 蛋白均从始基卵泡开始表达, 随着卵泡发育逐渐增

强, 至 Graafian 卵泡时呈现高强度表达信号。BMP15 在 PCOS 组和对照组卵母细胞中的表达没有差异(表 4)。

2.5 BMP15 在对照组和 PCOS 组颗粒细胞的表达及其差异

在对照组颗粒细胞中, BMP15 可表达于 48% 的始基卵泡和 75% 的初级卵泡, 在次级卵泡阶段没有明显增强, 在小窦卵泡达到较高水平。在 PCOS 组颗粒细胞中, BMP15 仅仅表达于 14% 的始基卵泡和 38% 的初级卵泡, 在之后的发育阶段逐渐增强, 同样在小窦卵泡达到较高水平。

在始基卵泡和初级卵泡的颗粒细胞中, BMP15 的阳性表达率在 PCOS 组均显著低于对照组 ($P < 0.001$, $P < 0.05$); 在次级卵泡阶段, BMP15 的表达在两组之间没有差异 ($P = 0.43$); 在 Graafian 卵泡也未发现两组颗粒细胞的表达强度存在差异。但是 PCOS 组和对照组 Graafian 卵泡数均

表 2 GDF9 在对照组和 PCOS 组卵母细胞的表达及其差异

Table 2 Expression of GDF9 protein located in oocytes

[n(%)]

Follice type(Follicle No.)		NE	+	++	+++
Primordial	PCOS (n = 175)	64(36.57) ²⁾	109(62.29) ¹⁾	2(1.14)	0
	Control (n = 44)	6(13.64)	36(81.82)	2(4.55)	0
Primary	PCOS (n = 42)	6(14.29) ¹⁾	35(83.33)	1(2.38)	0
	Control (n = 33)	0	30(90.95)	3(9.1)	0
Secondary	PCOS (n = 16)	4(25)	12(75)	0	0
	Control (n = 16)	0	16(100)	0	0
Graafian	PCOS (n = 7)	0	0	5(71.43)	2(28.57)
	Control (n = 8)	0	0	6(75)	2(25)

1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, PCOS vs. control.

表 3 GDF9 在对照组和 PCOS 组颗粒细胞的表达及其差异

Table 3 Expression of GDF9 protein located in granulosa cells

[n(%)]

Follice type (Follicle No.)		NE	+	++	+++
Primordial	PCOS (n = 176)	145(82.39) ²⁾	30(17.05) ²⁾	1(0.57)	0
	Control (n = 89)	35(51.69)	43(48.31)	0	0
Primary	PCOS (n = 45)	3(6.67)	25(55.56) ¹⁾	16(35.56) ²⁾	1(2.22)
	Control (n = 45)	0	9(20)	36(80)	0
Secondary	PCOS (n = 20)	4(20)	4(20)	12(60)	0
	Control (n = 17)	0	0	17(100)	0
Graafian	PCOS (n = 6)	0	0	5(83.33)	1(16.67)
	Control (n = 6)	0	0	66.67(4)	2(33.33)

1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.001$, PCOS vs. control.

表 4 BMP15 在对照组和 PCOS 组卵母细胞的表达及其差异

Follice type (Follice No.)		NE	+	++	+++
Primordial	PCOS (n = 97)	20(20.62)	63(64.95)	14(14.43)	0
	Control (n = 87)	20(22.99)	52(59.77)	15(17.24)	0
Primary	PCOS (n = 30)	0	21(70)	9(30)	0
	Control (n = 20)	2(10)	14(70)	4(20)	0
Secondary	PCOS (n = 14)	0	12(85.71)	2(14.29)	0
	Control (n = 14)	0	12(85.71)	2(14.29)	0
Graafian	PCOS (n = 6)	0	0	4(66.67)	2(33.33)
	Control (n = 7)	0	0	5(71.43)	2(28.57)

表 5 BMP15 在对照组和 PCOS 组颗粒细胞的表达及其差异

Follice type (Follice No.)		NE	+	++	+++
Primordial	PCOS (n = 99)	85(85.86) ²⁾	14(14.14) ²⁾	0	0
	Control (n = 89)	46(51.69)	43(48.31)	0	0
Primary	PCOS (n = 29)	18(62.07) ¹⁾	11(37.93) ¹⁾	0	0
	Control (n = 24)	6(25)	18(75.00)	0	0
Secondary	PCOS (n = 15)	3(20)	9(60)	3(20)	0
	Control (n = 14)	5(35.71)	5(35.71)	4(28.57)	0
Graafian	PCOS (n = 8)	0	0	7(87.75)	1(12.25)
	Control (n = 11)	0	0	9(81.82)	2(18.18)

1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.001$, PCOS vs. control.

较少,未能进行统计学分析。概括 BMP15 在 PCOS 组和对照组颗粒细胞中的表达差异可以发现,PCOS 组颗粒细胞的表达在次级卵泡才达到对照组初级卵泡的表达水平,提示存在表达滞后(表 5)。

3 讨 论

由于卵源性因子(OSFs)在卵泡发育和卵母细胞成熟过程中发挥重要的调节作用,其异常表达可能参与了某些卵泡发育障碍性疾病如 PCOS 或卵巢早衰的发生。本研究通过检测未经过促排卵刺激的 PCOS 卵巢组织和正常卵巢组织中 GDF9 和 BMP15 的蛋白水平,并比较两组之间卵源性因子的表达差异,进一步探讨 PCOS 卵泡发育紊乱的分子机制。

本研究结果发现在正常卵巢组织的卵母细胞中,GDF9 和 BMP15 的蛋白表达存在阶段依赖性,

均从始基卵泡开始,随着卵泡发育逐渐增强,在 Graafian 卵泡中呈现高表达。而在 PCOS 卵巢组织的卵母细胞中,GDF9 的蛋白表达强度较低并且存在表达滞后,而 BMP15 的表达在两组之间没有差异。这一结果与 Teixeira Filho 等^[2]的研究一致。他们采用原位杂交的方法对 PCOS 患者和正常妇女的卵巢组织进行研究,检测卵母细胞中 GDF9 和 BMP15 mRNA 的表达水平,发现在卵泡发育的早期阶段,PCOS 卵巢中 GDF9 mRNA 的表达落后于正常妇女,且在同期发育的卵泡中强度较低;而 BMP15 mRNA 的表达在两组之间没有差异。与之不同的是,他们的研究未能检测到颗粒细胞中 GDF9 和 BMP15 的阳性表达信号,而本研究不但检测到颗粒细胞中 GDF9 和 BMP15 的阳性表达,并且从蛋白水平比较了 PCOS 患者和正常妇女卵巢组织 GDF9 和 BMP15 的表达差异。在 Zhao 等^[1]的研究中也采用免疫组化法检测卵巢颗粒细胞中

GDF9 和 BMP15 的表达,但他们的研究使用的是经过卵巢刺激的废弃卵子复合物,与本研究所用的未经过卵巢刺激的卵巢组织有所不同。本研究发现正常卵巢的颗粒细胞中 GDF9 和 BMP15 的表达趋势与卵子中是一致的,这说明 OSFs 的表达在卵泡发育包括卵母细胞成熟和颗粒细胞增生过程中都发挥着重要的作用。鉴于 OSFs 在颗粒细胞功能调节方面的多样化作用,PCOS 卵巢中 OSFs 的降低和延迟表达可能会影响卵泡的正常发育以及卵子成熟。

卵子和颗粒细胞间的双向调节对卵子成熟和卵泡发育均起关键作用,而 OSFs 被认为是在这个双向调节过程中的扮演重要的角色^[12-14]。由卵子分泌的 GDF9 和 BMP15 可直接调节颗粒细胞的增生、分化、代谢、黄素化和凋亡,颗粒细胞的分泌信号也通过颗粒细胞间的缝隙连接调节卵子的生长和发育^[15-16]。正是由于卵子和颗粒细胞间的对话交流在卵泡发育过程中发挥着重要作用,所以 PCOS 卵巢组织中 GDF9 和 BMP15 的降低和延迟表达则不可避免的对卵泡发育产生负面影响。

本研究还发现 PCOS 卵母细胞和颗粒细胞中 GDF9 和 BMP15 的低表达主要体现在始基卵泡和初级卵泡阶段,提示 PCOS 患者的卵泡发育异常在早期阶段已经发生。而这一阶段的卵泡发育主要被卵巢自分泌和旁分泌因子所调控,由颗粒细胞产生的 AMH、胰岛素样生长因子及其结合蛋白、抑制素-激活素-卵泡抑素等构成复杂的网络共同调控卵泡发育^[17-21]。GDF9 和 BMP15 与卵母细胞成熟、颗粒细胞代谢相关。PCOS 卵泡 GDF9 和 BMP15 低表达可能抑制卵母细胞成熟,阻碍颗粒细胞代谢,影响卵泡正常发育。而在次级卵泡和小窦卵泡阶段,PCOS 卵巢中 GDF9 和 BMP15 的表达水平接近于正常卵巢组织,提示两种因子的表达可能存在代偿性增加。该结果表明卵巢存在实时调控机制,卵泡的正常生长发育是内分泌、旁分泌、自分泌等多种因子协调作用的结果。因此,研究卵巢局部因子在早期卵泡生长中的作用及其机制仍然是生殖医学领域的研究方向。

由于卵源性因子在卵泡发育的整个过程中都具有重要的调节作用,对其表达及调控的研究一直是生殖医学的重要课题。但是以往研究多集中在动物领域,对人类卵巢组织的研究相对较少。鉴于卵源性因子的表达和作用存在典型的物种差异

性^[22],有必要对人类卵巢组织进行检测以获得直接研究证据。另外,目前研究所采用的人类卵巢组织标本多来源于卵巢刺激后的患者,而卵巢刺激本身可能改变卵源性因子的表达水平^[23]。因此,更需要对未经历卵巢刺激的标本进行研究。本实验对未经历卵巢刺激的人类卵巢组织进行检测,并比较卵源性因子在 PCOS 和对照组卵巢组织中的表达差异,为研究 PCOS 卵泡发育紊乱的分子机制提供新的线索。

综上,GDF9 和 BMP15 蛋白在未刺激卵母细胞和颗粒细胞中均呈现阶段依赖性表达。伴随着始基卵泡发育至 Graafian 卵泡的生长过程,GDF9 和 BMP15 的表达也是逐渐增加。卵源性因子在 PCOS 早期卵泡阶段存在表达水平降低并且滞后现象,这种异常表达可能与 PCOS 卵泡发育紊乱和卵母细胞成熟障碍有关。由于卵巢内存在多种因子组成的网络调控模式,PCOS 卵巢组织中卵源性因子的异常表达可能是内分泌激素以及旁分泌因子共同调节的结果,但是具体的调控机制还需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan [J]. *BMC Med*, 2010, 8 (6): 41-45.
- [2] Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, et al. Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(3): 1337-1344.
- [3] Juengel JL, Mc Natty KP. The role of proteins of the transforming growth factor -beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development [J]. *Hum Reprod Update*, 2005, 11(2): 143-160.
- [4] Myllymaa S, Pasternack A, Mottershead DG, et al. Inhibition of oocyte growth factors in vivo modulates ovarian folliculogenesis in neonatal and immature mice [J]. *Reproduction*, 2010, 139(3): 587-598.
- [5] Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE. Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis [J]. *Semin Reprod Med*, 2009, 27 (1): 14-23.
- [6] Hunter MG, Paradis F. Intra-follicular regulatory mechanisms in the porcine ovary [J]. *Soc Reprod Fertil*

- Suppl, 2009, 66: 149-164.
- [7] Mottershead DG, Watson AJ. Oocyte peptides as paracrine tools for ovarian stimulation and oocyte maturation[J]. *Mol Hum Reprod*, 2009, 5(12): 789-794.
- [8] Juengel JL, Hudson NL, Berg M, et al. Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle[J]. *Reproduction*, 2009, 138(1): 107-114.
- [9] Chen Y, Zhao S, Qiao J, et al. Expression of bone morphogenetic protein-15 in human oocyte and cumulus granulosa cells primed with recombinant follicle-stimulating hormone followed by human chorionic gonadotropin[J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(6): 2045-2046.
- [10] The Rotterdam ESHRE /ASRM sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(1): 41-47.
- [11] Zhao SY, Qiao J, Chen YJ, et al. Expression of growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein-15 in oocytes and cumulus granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(1): 261-267.
- [12] Binelli M, Murphy BD. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2010, 22(1): 1-12.
- [13] Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(4): 399-413.
- [14] Yeo CX, Gilchrist RB, Lane M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence[J]. *Biol Reprod*, 2009, 80(5): 1072-1080.
- [15] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality[J]. *Hum Reprod Update*, 2008, 14(2): 159-177.
- [16] Albertini DF, Barrett SL. Oocyte-somatic cell communication[J]. *Reprod Suppl*, 2003, 61: 49-54.
- [17] Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE. Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis[J]. *Semin Reprod Med*, 2009, 27(1): 14-23.
- [18] McNatty KP, Heath DA, Lundy T, et al. Control of early ovarian follicular development[J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1999, 54: 3-16.
- [19] Monget P, Bondy C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 163(1-2): 89-93.
- [20] Knight PG, Glister C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary [J]. *Reproduction*, 2001, 121(4): 503-512.
- [21] Silva JR, Figueiredo JR, van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis [J]. *Theriogenology*, 2009, 71(8): 1193-208.
- [22] Lin JY, Pitman-Crawford JL, Bibby AH, et al. Effects of species differences on oocyte regulation of granulosa cell function[J]. *Reproduction*, 2012, 144(5): 557-567.
- [23] Sánchez F, Adriaenssens T, Romero S, et al. Different follicle-stimulating hormone exposure regimens during antral follicle growth alter gene expression in the cumulus-oocyte complex in mice [J]. *Biol Reprod*, 2010, 83(4): 514-524.

(编辑 徐杰)