

沉默*Smad8*基因对小鼠卵泡颗粒细胞增殖的影响

余道伦^{1#} 陈芳慧^{2#} 张莉¹ 王和建¹ 陈杰¹ 张宗猛¹李洁¹ 邢朝凤¹ 李君^{1*} 蔡亚非^{1,2*}¹安徽师范大学生命科学学院, 重要生物资源保护与利用研究安徽省重点实验室, 芜湖 241000;²南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要 SMAD8(又称SMAD9)蛋白质是TGF- β /SMADs信号通路中重要的转录因子。该研究利用RNA干扰技术沉默*Smad8*基因, 探讨该基因对小鼠卵泡颗粒细胞增殖的影响。免疫组化技术对SMAD8在小鼠卵泡的表达进行定位, 设计并合成*Smad8*-siRNA转染小鼠颗粒细胞, 荧光定量PCR(qPCR)和Western blot检测*Smad8*基因沉默效率, CCK-8法分析颗粒细胞增殖能力, ELISA检测细胞上清中雌二醇(E₂)和孕酮(P₄)浓度, qPCR检测颗粒细胞促卵泡素受体(follicle stimulating hormone receptor, *FSHR*)、促黄体素受体(luteinizing hormone receptor, *LHR*)以及与细胞增殖相关的细胞周期调控蛋白基因*Cyclin D2*和*CDK4* mRNA水平。结果显示, SMAD8仅表达于卵泡的颗粒细胞, *Smad8*-siRNA有效抑制了*Smad8*的表达($P < 0.01$), *Smad8*沉默后颗粒细胞的增殖能力明显减弱, 细胞上清中E₂水平显著下降, P₄水平未受影响, 颗粒细胞*LHR*、*Cyclin D2*和*CDK4* mRNA水平明显降低, *FSHR* mRNA无明显变化。以上结果表明, 沉默*Smad8*基因降低了小鼠颗粒细胞的增殖能力, 其机制可能与沉默*Smad8*调低了颗粒细胞增殖分化相关的E₂合成以及*LHR*、*Cyclin D2*和*CDK4*的表达下降有关。

关键词 小鼠; *Smad8*基因; RNA干扰; 颗粒细胞增殖

Effect of Silence *Smad8* Gene on Proliferation of Granulosa Cells in Mice

Yu Daolun^{1#}, Chen Fanghui^{2#}, Zhang Li¹, Wang Hejian¹, Chen Jie¹, Zhang Zongmeng¹,Li Jie¹, Xing Chaofeng¹, Li Jun^{1*}, Cai Yafei^{1,2*}¹College of Life Sciences, Anhui Provincial Key Lab of the Conservation and Exploitation of Biological Resources, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China; ²College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract SMAD8 (also named SMAD9) protein is one of the important transcription factors in TGF- β /SMADs signaling pathway. In this study, RNAi was used to explore the effect of silencing *Smad8* gene expression on proliferation of mouse granulosa cells (MGCs). Immunohistochemistry was used to locate SMAD8 expression in mouse follicle. *Smad8* gene siRNA was designed and synthesized to transfect MGCs and *Smad8* gene was detected

收稿日期: 2017-11-25 接受日期: 2018-02-02

国家自然科学基金(批准号: 31572265)、安徽省科学研究平台创新团队、南京农业大学启动基金(批准号: 804090)和江苏省“三新”工程(批准号: SXGC[2016]312)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0553-3869297, E-mail: lijunplant@163.com; E-mail: ycai@njau.edu.cn

Received: November 25, 2017 Accepted: February 2, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31572265), Innovation Team of Scientific Research Platform in Anhui Province, A Start-Up Grant from Nanjing Agricultural University (Grant No.804090) and “Sanxin” Research Program of Jiangsu Province (Grant No.SXGC[2016]312)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-553-3869297, E-mail: lijunplant@163.com; E-mail: ycai@njau.edu.cn

网络出版时间: 2018-05-15 18:10:31 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180515.1810.014.html>

by qPCR and Western blot after transfection with *Smad8*-siRNA. Cell proliferation capacity was analyzed by CCK-8 and the concentrations of E_2 and P_4 in supernatant were determined by ELISA. The qPCR was performed to measure *FSHR*, *LHR*, *Cyclin D2*, *CDK4* mRNA levels in granulosa cells after transfection with *Smad8*-siRNA. The results showed that *Smad8* gene expression was effectively inhibited by *Smad8*-siRNA ($P < 0.01$), cell proliferation capacity was significantly weakened. E_2 , *LHR*, *Cyclin D2* and *CDK4* mRNA levels were significantly decreased, but P_4 and *FSHR* mRNA remain unchanged. These results indicated that the silencing *Smad8* gene decreased the proliferation ability of MGCs, and its mechanism might be related to the decline of E_2 secretion and *LHR*, *Cyclin D2*, *CDK4* expression decrease after *Smad8* gene silence.

Keywords mice; *Smad8* gene; RNA interference; granulosa cells proliferation

SMAD蛋白质是TGF- β /SMADs信号通路下游重要的转录因子, 介导细胞外TGF- β 信号在细胞内的转导^[1-3]。SMADs蛋白质家族至少包括8种SMAD蛋白质, 按功能分为3类: 即受体活化型R-SMADs、共同通路型Co-SMAD(如SMAD4)和抑制型I-SMADs(如SMAD6/7)。其中, R-SMADs能被I型受体(TGF- β binding to the type I receptor, T β RI)激活并与受体形成短暂复合物, 它又分为两类, 即由激活素TGF- β 激活的AR-SMADs(包括SMAD2/3)以及由BMP等激活的BR-SMADs(包括SMAD1/5/8)。研究表明, TGF- β /SMADs信号通路在哺乳动物卵巢卵泡的发育、卵泡的闭锁与选择过程中发挥极其重要的调控作用^[4-5]。

SMAD8是SMADs蛋白质家族中最后一个被发现的成员, 有关SMAD8的研究鲜见报道, 具体作用机制不明。由于*Smad8*具有一个特殊的连接区, 其转录活性显著低于*Smad1*和*Smad5*。有研究表明, *Smad8*过表达能够通过显性抑制的方式抑制靶基因的转录, 进而降低BMP信号的活性^[6], 因此, *Smad8*在平衡BMP/SMADs信号中发挥着关键作用。另有报道表明, *Smad8*涉及鹅卵泡发育的启动过程^[7], 然而对其是否调控卵泡发育及其潜在机制尚不明确。为探索*Smad8*影响卵泡发育的潜在机制, 本研究利用免疫组化技术对SMAD8在小鼠卵泡的表达进行了定位, 设计并合成*Smad8*的siRNA转染体外培养的小鼠颗粒细胞, 利用qPCR和Western blot方法分析了*Smad8*的沉默效率, 对沉默后颗粒细胞的增殖能力, 细胞培养上清中雌二醇(E_2)和孕酮(P_4)的浓度以及颗粒细胞促卵泡素受体(follicle stimulating hormone receptor, *FSHR*)、促黄体素受体(luteinizing hormone receptor, *LHR*)、*Cyclin D2*和*CDK4* mRNA水平进行了定量分析, 以此探讨*Smad8*对颗粒细胞增殖的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

选取8周龄健康的KM鼠母鼠10只, 实验鼠购自南京青龙山动物繁殖场。所有动物实验均经过安徽师范大学伦理委员会批准。PMSG购自三生公司。DMEM-F12培养基和新生胎牛血清(FBS)购自美国Gibico公司。siRNA-mate转染试剂购自上海吉玛制药技术有限公司。RIPA裂解液、PMSF和免疫组化SABC试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。BCA蛋白质浓度测定试剂盒和细胞增殖检测CCK-8试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。鼠SMAD8一抗购自美国Abcam公司。鼠GAPDH一抗和抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。Trizol购自美国Invitrogen公司。反转录和荧光定量PCR(qPCR)试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司。雌二醇(E_2)和孕酮(P_4)ELISA试剂盒购自哈灵生物科技有限公司。Western blot实验所用试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 主要方法

1.2.1 免疫组化定位SMAD8在鼠卵泡上的表达位置
取自PMSG促发情48 h后的2只小鼠卵巢经固定、石蜡包埋、切片(5 μ m)和抗原热修复后按照SABC免疫组化试剂盒上的步骤确定SMAD8在卵泡上的表达。

1.2.2 siRNA的序列筛选与转染
针对鼠*Smad8*基因的6对siRNA序列由上海吉玛公司设计并合成, 经过预实验筛选最终确定鼠*Smad8*-siRNA正义链序列为: CCU UAC CAU GCA AGA GAA ATT(5'→3'); 反义链列为: UUU CUC UUG CAU GGU AAG GTT(5'→3')。阴性对照NC-siRNA的无关干扰序列中正义序列为: UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT(5'→3'); 反义序列为: ACG UGA GUU CGG AGA ATT(5'→3')。从PMSG促发情48 h后的8只小

鼠卵巢上采用机械分离法获得的颗粒细胞培养于含有10% FBS的DMEM-F12培养基中, 培养箱环境条件为37 °C、5% CO₂。将处于对数生长期的颗粒细胞用胰蛋白酶消化后重悬, 6孔板中每孔加入2 mL重悬细胞, 使细胞密度达到1.5×10⁵~3.5×10⁵/mL, 接板24 h后进行转染实验, 转染步骤按照siRNA-mate说明书操作。

1.2.3 实验分组 实验设三组分别为: 空白对照组(不添加任何药物处理)、实验组(转染*Smad8*-siRNA终浓度为16.7 nmol/L)、阴性对照组(转染NC-siRNA终浓度为16.7 nmol/L)。各组转染48 h后收获细胞和培养上清进行检测分析。

1.2.4 qPCR检测*Smad8*、*Smad1*、*Smad5*、*FSHR*、*LHR*、*Cyclin D2*和*CDK4*的mRNA水平 Trizol法提取转染后细胞的总RNA, 利用核酸蛋白分析仪检测总RNA样品纯度D₂₆₀/D₂₈₀为1.8~2.1区间时视为合格, 可以进行后续的qPCR。根据鼠*Smad8*、*Smad1*、*Smad5*、*FSHR*、*LHR*、*Cyclin D2*、*CDK4*和*GAPDH*基因的mRNA序列, 利用Primer 5.0和Oligo 6.0设计qPCR引物。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 相关引物信息如表1所示。每个样品检测设三个重复, 以空白组为对照组, *GAPDH*为内参, 按照2^{-ΔΔCt}方法分析转染后各基因的表达情况^[8]。

1.2.5 SMAD8蛋白质水平的检测 RIPA法提取细胞总蛋白, BCA法测定蛋白质浓度, Western blot方法测定三组细胞中SMAD8的水平。

1.2.6 CCK-8法检测细胞增殖能力 96孔板中每孔加入100 μL约2 000个细胞, 分别设空白对照组、实验组和无关序列组, 分别于转染后的6、12、18、

24、36和48 h检测各组细胞的吸光度(D)值。在测定前1 h每孔加入10 μL CCK-8溶液, 然后再在细胞培养箱内继续孵育1 h后于酶标仪上D₄₅₀进行测定。

1.2.7 ELISA检测细胞培养上清中E₂和P₄的浓度 将保存于-80 °C的细胞培养上清液取出并在室温下解冻, 按照所购ELISA检测试剂盒上的步骤分别测定三个实验组细胞培养上清中E₂和P₄的浓度。

1.3 统计学分析

所有实验均重复三次, 所得数据利用SPSS 19.0软件进行One-Way ANOVA分析, P<0.05为有统计学差异, 数据均以means±S.E.表示。

2 结果

2.1 SMAD8在卵泡中的定位

小鼠卵巢免疫组化结果显示, SMAD8仅表达于卵泡的颗粒细胞层(图1)。

2.2 颗粒细胞*Smad8*-siRNA转染效率分析

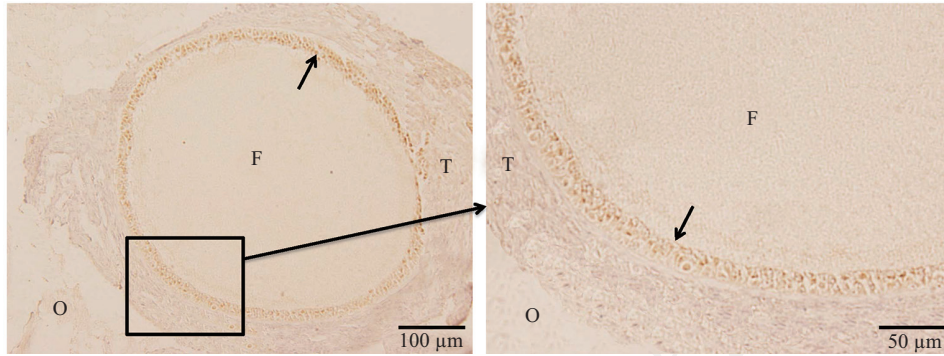
Smad8-siRNA转染48 h后qPCR检测显示, 实验组较空白对照组*Smad8* mRNA水平下降71%, 差异具有统计学意义(P<0.01, 图2A)。Western blot结果表明, *Smad8*-siRNA转染48 h后SMAD8蛋白质水平较空白对照组下降78%, 差异具有统计学意义(P<0.01, 图2B和图2C)。为了排除*Smad8*-siRNA可能对其他的BR-SMADS水平产生影响。实验同时检测了*Smad1/5* mRNA的水平, 结果显示, *Smad1/5* mRNA水平未受*Smad8*干扰的影响(P>0.05, 图2D和图2E)。

2.3 沉默*Smad8*对颗粒细胞增殖的影响

CCK-8法检测结果显示, 实验组细胞增殖效率显著低于空白对照组(P<0.05, 图3), 无关序列干扰组和空白对照组之间无显著差异(P>0.05)。

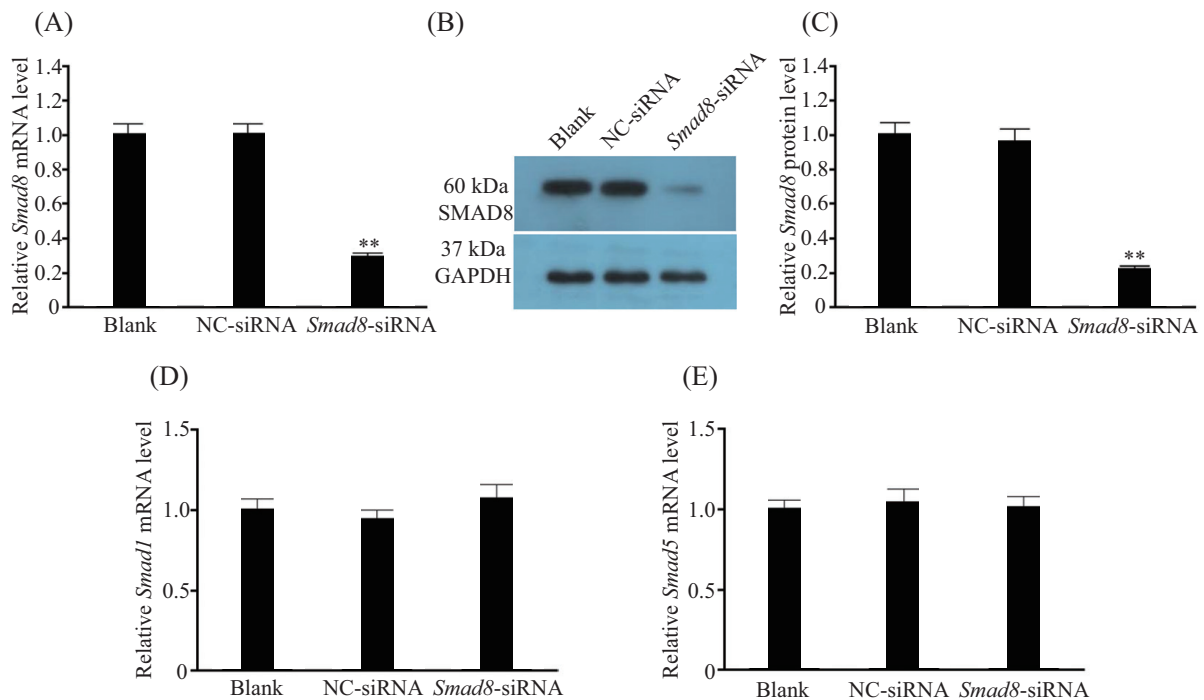
表1 qPCR所用引物
Table 1 Primers for qPCR

基因 Gene	正向引物(5'→3') Forward (5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse (5'→3')	产物大小(bp) Production size (bp)
<i>Smad8</i>	CGA TCA TTC CAT GAA GCT GAC AA	TGG GCA AGC CAA ACC GAT A	149
<i>Smad1</i>	CAG CTA CTG GCG CAG TCT GT	ACA TCC TGC CGG TGG TAT TC	119
<i>Smad5</i>	TGC TCA GCT TCT GGC TCA GT	GTG ACG TCC TGT CGG TGG TA	126
<i>FSHR</i>	TGC TCT AAC AGG GTC TTC CTC	TCT CAG TTC AAT GGC GTT CCG	84
<i>LHR</i>	AAT GAG TCC ATC ACG CTG AAA C	CCT GCA ATT TGG TGG AAG AGA	187
<i>Cyclin D2</i>	GCA GCA GTT CCG TCA AGA GCA G	CGA ATG GCT TCC TCA CAG GTC AAC	112
<i>CDK4</i>	TGG TGC CAG AGA TGG AGG AGT C	TCG GAA GGC AGA GAT TCG CTT ATG	86
<i>GAPDH</i>	AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG	TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA	129



F: 卵泡; O: 卵巢; T: 卵泡内膜; 箭头指向颗粒细胞层上的SMAD8信号。
F: follicle; O: ovary; T: theca interna; Arrows indicate SMAD8 signaling in GCs layer.

图1 SMAD8表达于小鼠卵泡的颗粒细胞层
Fig.1 SMAD8 expression in the granulosa cells layer of mouse follicle



A: siRNA转染48 h后*Smad8* mRNA的表达, ** $P < 0.01$, 与空白对照组比较; B、C: siRNA转染48 h后SMAD8蛋白质水平, ** $P < 0.01$, 与空白对照组比较; D、E: siRNA转染48 h后*Smad1/5* mRNA水平。

A: level of *Smad8* mRNA after transfection with siRNA for 48 h, ** $P < 0.01$ compared with blank group; B,C: level of SMAD8 protein after transfection with siRNA for 48 h, ** $P < 0.01$ compared with blank group. D,E: level of *Smad1/5* mRNA after transfection with siRNA for 48 h.

图2 颗粒细胞*Smad8*-siRNA转染效率分析

Fig.2 The analysis of transfection efficiency of granulosa cells *Smad8*-siRNA

2.4 沉默*Smad8*后细胞上清中的 E_2 浓度显著降低而 P_4 浓度未见明显变化

ELISA检测结果显示, E_2 浓度实验组较对照组下降了38%, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表2), P_4 浓度实验组较空白对照组无显著差异。

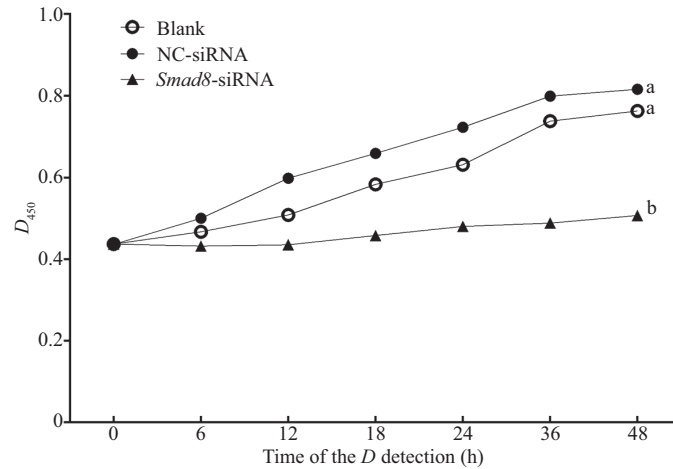
2.5 沉默*Smad8*后*LHR*、*Cyclin D2*和*CDK4* mRNA水平明显下降而*FSHR* mRNA水平未受影响

qPCR检测显示, siRNA转染48 h后*FSHR* mRNA

水平在实验组和空白对照组无明显差异($P > 0.05$, 图4A), *LHR*、*Cyclin D2*和*CDK4* mRNA水平实验组较空白对照组分别下降了83%、74%和85%, 差异具有统计学意义($P < 0.01$, 图4B~图4D)。

3 讨论

研究表明, TGF- β /SMADs信号通路参与了胚胎早期发生、骨形成和组织修复等过程, 在细胞的增



曲线上标不同字母代表差异显著($P < 0.05$), 相同字母代表差异不显著($P > 0.05$)。

The curves with different superscript letters mean significant difference ($P < 0.05$), with same superscript letters mean no significant difference ($P > 0.05$).

图3 沉默*Smad8*对颗粒细胞增殖能力的影响

Fig.3 The effect of *Smad8* silencing on the proliferation of granulosa cells

表2 沉默*Smad8*后细胞上清中E₂和P₄的浓度

Table 2 Concentration of E₂ and P₄ in supernatant after *Smad8* silencing

分组	雌二醇($\times 10^{-4}$ $\mu\text{mol/L}$)	孕酮($\times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)
Groups	E ₂ ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{mol/L}$)	P ₄ ($\times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)
Blank	1.01 ^a	1.10 ^a
NC-siRNA	1.03 ^a	1.11 ^a
<i>Smad8</i> -siRNA	0.63 ^b	1.07 ^a

数值上标不同字母代表差异显著($P < 0.05$), 相同字母代表差异不显著($P > 0.05$)。

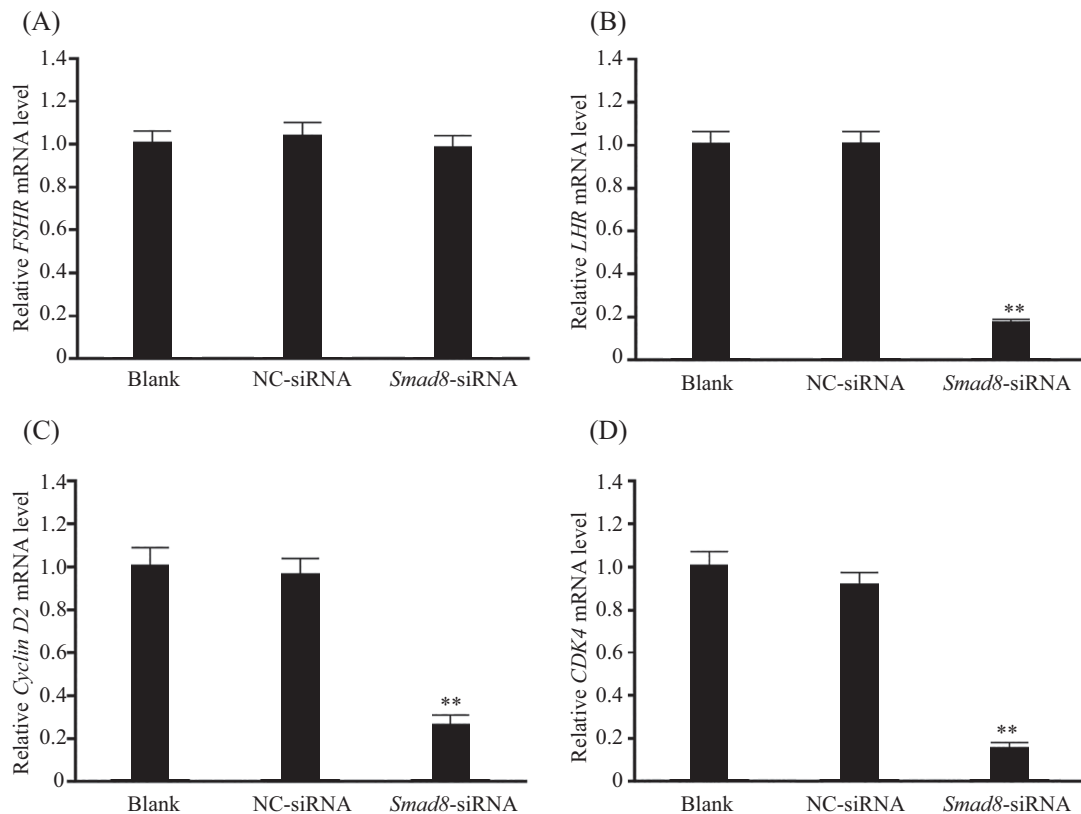
Values with different superscript letters in the same rank mean significant difference ($P < 0.05$), with same superscript letters mean nonsignificant difference ($P > 0.05$).

殖、分化、迁移和凋亡以及免疫和内分泌等方面发挥着重要的调节作用^[9-11]。近来的研究发现, TGF- β /SMADs信号通路在哺乳动物的卵巢卵泡的发育、卵泡的闭锁与选择过程中发挥极其重要的调控作用^[12-13]。在这一过程中, 该通路中的关键成员(配体、受体、信号分子等)在整个生殖系统中都有协调的时空表达模式、控制和调节卵巢的生理学功能^[14-15]。SMAD8作为TGF- β /SMADs信号通路下游重要的转录因子, 广泛分布于不同的组织并介导多种类型的生理过程^[16]。本研究中免疫组化实验明确了SMAD8在小鼠卵巢仅表达于卵泡的颗粒细胞层, 因此推断, *Smad8*与小鼠卵泡颗粒细胞的发育存在密切关联。

RNA干扰技术是目前研究基因功能的常用手段, 为阐明转录因子SMAD8对颗粒细胞发育的潜在作用。本研究针对*Smad8*基因设计siRNA干扰序列并转染小鼠体外培养的颗粒细胞, qPCR检测结果显示, 干扰后*Smad8* mRNA水平较空白对照组显著下

降了71%, 表明所设计的siRNA对*Smad8*的沉默作用是有效的。

大量研究表明, 颗粒细胞的发育与卵泡的发育成熟和排卵密切相关^[17-20]。而颗粒细胞的发育过程又受到多种激素和激素受体的调节, 这其中E₂和P₄, *FSHR*和*LHR*分别是影响这一调节过程的代表激素和激素受体, 它们与其他因子的相互协同作用是颗粒细胞增殖、分化以及卵泡成熟和排卵的内在诱因^[21-25]。此外, 研究发现, 有丝分裂原活化蛋白激酶(Ras-MAPK)信号通路以及BMPs在调节颗粒细胞的类固醇合成中发挥着重要作用^[26-28], 它们通过改变类固醇合成酶基因表达来调节颗粒细胞类固醇的合成。体外大鼠颗粒细胞的培养实验表明, BMP4和BMP7可以提高FSH依赖的E₂的分泌^[29], 而BMP4、BMP6、BMP7和BMP15抑制FSH诱导的P₄的分泌^[29-32]。其他研究也表明, 阻断BMP/SMADs信号通路抑制了类固醇合成酶基因*Cyp19a1*的表达^[33]。本实验在沉默*Smad8*基因后, ELISA检测结果显示, 细



** $P < 0.01$, 与空白对照组比较。

** $P < 0.01$ compared with blank group.

图4 沉默*Smad8*对*FSHR*、*LHR*、*Cyclin D2*和*CDK4* mRNA水平的影响

Fig.4 Effect of *Smad8* silence on the levels of *FSHR*, *LHR*, *Cyclin D2* and *CDK4* mRNA

胞上清中的 E_2 水平较空白对照组显著下降了38%, P_4 水平无显著变化; 同期qPCR检测结果显示, 颗粒细胞表达的*FSHR* mRNA在干扰组和空白对照组之间无显著差异, 而*LHR* mRNA水平较空白对照组显著下降了83%。这些结果表明, 对颗粒细胞发育具有重要影响的 E_2 和*LHR*表达在*Smad8*基因沉默后均显著下降, 可能是沉默*Smad8*后引起了Ras-MAPK和BMP/SMADs信号通路对颗粒细胞类固醇合成以及相关激素受体表达的调控变化导致的结果, 然而其具体调控机制仍有待进一步研究。

研究表明, 细胞增殖依赖于细胞周期, 而细胞周期受多种细胞周期蛋白的调控^[34-35]。本研究采用CCK-8法检测颗粒细胞的增殖能力, 其结果显示, 沉默*Smad8*后颗粒细胞的增殖能力明显减弱。进一步检测发现, 与细胞周期发育相关的细胞周期蛋白基因*Cyclin D2*和*CDK4*表达在*Smad8*基因沉默后均显著下降, 因此推测, 颗粒细胞的增殖能力在*Smad8*沉默后明显减弱与促进颗粒细胞周期发育的细胞周期蛋白基因表达下降有关。

综上所述, 本文首次对SMAD8在小鼠卵巢的表达进行了精准定位, 且首次在体外实验证实了*Smad8*基因表达变化可以直接影响颗粒细胞增殖、分化相关的 E_2 合成和*LHR*的表达以及对细胞周期发育至关重要的*Cyclin D2*和*CDK4*的表达, 进而影响到卵泡颗粒细胞的增殖。因此, 推测*Smad8*基因可能是调控颗粒细胞发育的主效基因之一, 未来, 对*Smad8*基因功能的深入研究有可能为人工干预动物繁殖、提高动物繁殖力等提供新的思路和途径。

参考文献 (References)

- 1 Wrighton KH, Lin X, Feng XH. Phospho-control of TGF- β superfamily signaling. *Cell Res* 2009; 19(1): 8-20.
- 2 Lan HY. Transforming growth factor- β /Smad signalling in diabetic nephropathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39(8): 731-8.
- 3 Wakefield LM, Hill CS. Beyond TGF- β : roles of other TGF- β superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(5): 328-41.
- 4 Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor beta and Smad signaling in kidney diseases. *Nephrol Carlton* 2005; 10(1): 48-56.

- 5 Pangas SA, Matzuk MM. Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 225(12): 83-91.
- 6 Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, *et al.* Smad9 is a new type of transcriptional regulator in bone morphogenetic protein signaling. *Sci Rep* 2014; doi: 10.1038/srep07596.
- 7 Xu J, Li J, Wang H, Wang G, Chen J, Huang P, *et al.* A novel SMAD family protein, SMAD9 is involved in follicular initiation and changes egg yield of geese via synonymous mutations in exon1 and intron2. *Mol Biol Rep* 2015; 42(1): 289-302.
- 8 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- 9 Runyan CE, Liu Z, Schnaper HW. Phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 GTPase inversely regulate the Smad anchor for receptor activation (SARA) protein independently of transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem* 2012; 287(43): 35815-24.
- 10 Wan M, Li CJ, Zhen GH, Jiao K, He WY, Jia XF, *et al.* Injury-activated transforming growth factor beta controls mobilization of mesenchymal stem cells for tissue remodeling. *Stem Cells* 2012; 30(11): 2498-11.
- 11 Pangas SA. Bone morphogenetic protein signaling transcription factor (SMAD) function in granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 356(12): 40-7.
- 12 Wang W, Wang L, Li XX, Chen X, Zhang HY, He Y, *et al.* Effect of interrupted endogenous BMP/Smad signaling on growth and steroidogenesis of porcine granulosa cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 2010; 11(9): 719-27.
- 13 Pangas SA, Matzuk MM. Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 225(12): 83-91.
- 14 Mottershead DG, Pulkki MM, Muggalla P, Pasternack A, Tolonen M, Myllymaa S, *et al.* Characterization of recombinant human growth differentiation factor-9 signaling in ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 283(1/2): 58-67.
- 15 Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG. Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary. *Domest Anim Endocrin* 2005; 28(4): 367-79.
- 16 Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000; 19(8): 1745-54.
- 17 Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL. Stage of ovarian follicular development associated with the initiation of steroidogenic competence in avian granulosa cells. *Biol Reprod* 1991; 44(2): 305-14.
- 18 Zhang CP, Yang JL, Zhang J, Li L, Huang L, Ji SY, *et al.* Notch signaling is involved in ovarian follicle development by regulating granulosa cell proliferation. *Endocrinology* 2011; 152(6): 2437-47.
- 19 Makita M, Miyano T. Steroid hormones promote bovine oocyte growth and connection with granulosa cells. *Theriogenology* 2014; 82(4): 605-12.
- 20 Fitzharris G, Baltz JM. Granulosa cells regulate intracellular pH of the murine growing oocyte via gap junctions: development of independent homeostasis during oocyte growth. *Development* 2006; 133(4): 591-9.
- 21 McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21(2): 200-14.
- 22 Caicedo Rivas RE, Nieto MP, Kamiyoshi M. Effects of steroid hormone in avian follicles. *Asian-Australas J Anim Sci* 2016; 29(4): 487-99.
- 23 Calvo FO, Bahr JM. Adenylyl cyclase system of the small preovulatory follicles of the domestic hen: responsiveness to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Biol Reprod* 1983; 29(3): 542-7.
- 24 Regan SL, McFarlane JR, O'Shea T, Andronicos N, Arfuso F, Dharmarajan A, *et al.* Flow cytometric analysis of *FSHR*, *BMRR1B*, *LHR* and apoptosis in granulosa cells and ovulation rate in merino sheep. *Reproduction* 2015; 150(2): 151-63.
- 25 Wei S, Chen S, Gong Z, Ouyang X, An L, Xie K, *et al.* Alarelin active immunization influences expression levels of GnRHR, *FSHR* and *LHR* proteins in the ovary and enhances follicular development in ewes. *Anim Sci J* 2013; 84(6): 466-75.
- 26 Fan HY, Shimada M, Liu ZL, Cahill N, Noma N, Wu Y, *et al.* Selective expression of *Kras^{G12D}* in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development* 2008; 135(12): 2127-37.
- 27 Fan HY, Liu ZL, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedric SM, *et al.* MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 2009; 324(5929): 938-41.
- 28 Winters TA, Hanten JA, Veldhuis JD. In situ amplification of the cytochrome P-450 cholesterol side-chain cleavage enzyme mRNA in single porcine granulosa cells by IGF-1 and FSH acting alone or in concert. *Endocrine* 1998; 9(1):57-63.
- 29 Shimasaki S, Zachow RJ, Li DM, Kim H, Iemura SI, Ueno N, *et al.* A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(13): 7282-7.
- 30 Otsuka F, Yao ZX, Lee TH, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 2000; 275(50): 39523-8.
- 31 Fraser M, Braems GA, Challis JR. Developmental regulation of corticotrophin receptor gene expression in the adrenal gland of the ovine fetus and newborn lamb: effects of hypoxia during late pregnancy. *J Endocrinol* 2001; 169(1): 1-10.
- 32 Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod* 2001; 65(4): 994-9.
- 33 Wang W, Wang L, Li XX, Chen X, Zhang HY, He Y, *et al.* Effect of interrupted endogenous BMP/Smad signaling on growth and steroidogenesis of porcine granulosa cells. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2010; 11(9): 719-27.
- 34 Paterson IC, Davies M, Stone A, Huntley S, Smith E, Pring M, *et al.* TGF-beta1 acts as a tumor suppressor of human malignant keratinocytes independently of Smad4 expression and ligand-induced G(1) arrest. *Oncogene* 2002; 21(10): 1616-24.
- 35 Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He DM, Long JY, Liu F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* 2004; 430(6996): 226-31.