

# NOS及NO/cGMP信号通路对哺乳动物 卵泡发育的调控作用

许木林 郑开之 孙思宇 石放雄\*

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

**摘要** 一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种重要的多功能因子,能够介导许多生理功能,尤其是哺乳动物卵巢功能的调控。一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)作为NO合成的限速酶,是调节NO合成的关键,具有神经型(neuronal NOS, nNOS)、诱导型(inducible NOS, iNOS)及内皮型(endothelial NOS, eNOS)三种类型。近年来的研究表明, NOS及一氧化氮/环鸟苷酸(nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate, NO/cGMP)信号通路对哺乳动物的卵泡发育具有调节作用。该文就NOS及NO/cGMP信号通路在卵泡发育方面的主要研究进展进行评述并提出了展望。

**关键词** NOS; NO/cGMP; 卵泡发育

## Regulatory Effects of NOS and NO/cGMP Signaling Pathway on Mammalian Follicular Development

Xu Mulin, Zheng Kaizhi, Sun Siyu, Shi Fangxiong\*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract** Nitric oxide is a multifunctional factor mediating multiple biological effects, especially in regulation of mammalian ovarian functions. Nitric oxide synthases (NOS) are key rate-limiting enzymes in NO synthesis and have three types: neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS) and endothelial NOS (eNOS). Recent studies showed that NOS and nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway had a great impact on mammalian follicular development. This article focuses on the effect and prospect of NOS and NO/cGMP signaling pathway on mammalian follicular development.

**Key words** NOS; NO/cGMP; follicular development

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种分子量为30道尔顿的小分子自由基,结构简单且易运动,能溶于水及脂质载体。体内NO具有两个主要的生理作用:细胞毒作用和细胞间的信号传递或称信使作用<sup>[1]</sup>。NO作为气体信号分子,是许多生理过程的重要调节因

子,能通过多种方式作用于下游的信号分子,如NO以环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)作为第二信使激活可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylatecyclase, sGC),导致cGMP含量增加的cGMP依赖途径<sup>[2]</sup>;以及与含有血红素的蛋白质结合、直接与靶蛋白反应,从而调节细胞功能的非cGMP依赖途径<sup>[3]</sup>。NO信号通路在哺乳动物卵巢功能调控过程中具有重要的作用,因此,可以通过调控NO的生物合成来影响NO信号通路在卵巢功能中的作用。体内NO主要由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)合成并释放。

NO/cGMP信号转导通路是细胞内重要的信号

收稿日期: 2013-02-27 接受日期: 2013-04-15

国家自然科学基金(批准号: 31172206)资助的课题

\*通讯作者。Tel/Fax: 025-84399112, E-mail: fxshi@njau.edu.cn

Received: February 27, 2013 Accepted: April 15, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31172206)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84399112, E-mail: fxshi@njau.edu.cn

网络出版时间: 2013-06-21 14:16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130621.1416.001.html>

通路,参与众多生理过程<sup>[4-5]</sup>。cGMP(3',5'-环鸟苷酸)作为普遍存在于生物体内的第二信使物质参与介导激素、光和神经递质等细胞外信号的生物学效应,在卵巢卵泡的凋亡及闭锁、生长发育中也具有重要的意义。本文对NOS及NO/cGMP信号转导通路对哺乳动物卵泡发育的调控作用进行总结和概括,以期对哺乳动物卵泡功能的调控提供新的研究方向和理论基础。

## 1 NOS

一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)作为在NO生成过程中的关键酶,在结构和功能上有三种异构型:神经型(neuronal NOS, nNOS或NOS I)、诱导型(inducible NOS, iNOS或NOS II)和内皮型(endothelial NOS, eNOS或NOS III)<sup>[6]</sup>。三种同工酶的分子量为130-160 KDa,氨基酸序列、组织分布、转录和细胞内钙离子激活等方面不完全相同。其中, nNOS和eNOS又被称为结构型NOS(constitutive NOS, cNOS), 它们是Ca<sup>2+</sup>依赖型, 大多是胞浆型。NOS III颗粒型>90%, 为非Ca<sup>2+</sup>依赖型。三种NOS氨基酸序列在种属间具有高度保守性。在细胞内既可存在于可溶性成分中, 也可存在于一定的亚细胞器

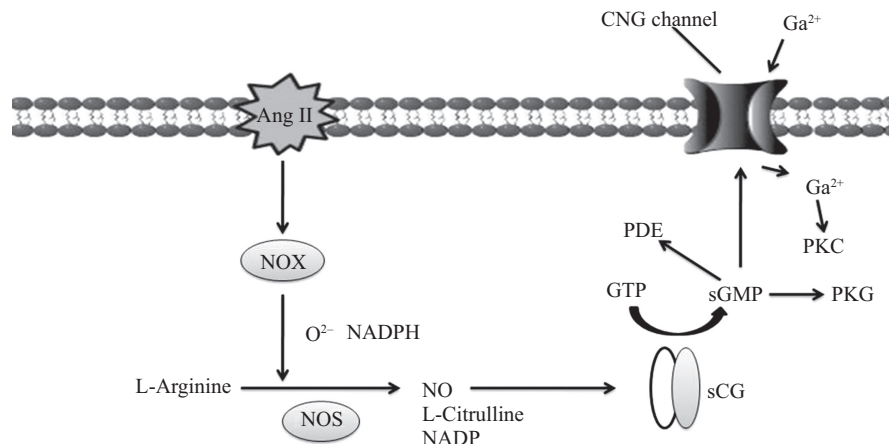
中<sup>[7]</sup>。

NOS蛋白家族在结构上普遍具有加氧酶区、钙调蛋白区(calmodulin, CaM)及还原酶区。加氧酶区由血红素(heme)、L-四氢化喋呤构成, 还原酶区由黄素单核苷酸(flavine mononucleotide, FMN)、黄素腺嘌呤二核苷酸(flavine adenine dinucleotide, FAD)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADPH)构成, NADPH、FAD、FMN构成电子传递链。NOS都是二聚后才具有催化活性, 其二聚体是由两个一致性的单体构成, 每个单体实质上基本由两种酶融合而成, C末端还原酶区域和N末端氧化酶区域。C末端区域与细胞色素P450还原酶一些序列有显著的同源性, N末端区域具有结合四氢生物喋呤(tetrahydrobiopterin, BH<sub>4</sub>)和血红素的位点, 也是L-精氨酸底物。这两个区域之间有钙调蛋白结合位点, 在酶的结构和功能上发挥关键作用<sup>[8]</sup>。

## 2 NO/cGMP信号转导通路

### 2.1 NO/cGMP信号通路的生物学作用

NO/cGMP信号转导系统广泛存在于体内, 是胞内重要的信号通路, 参与众多的生理过程。研究证



当体外刺激因子血管紧张素(angiotensin, Ang) II等与细胞膜表面受体结合时, 细胞内的NADPH氧化亚基被诱导并转移到细胞膜上, 并与相关的亚基相互作用, 形成NADPH氧化酶(NOX)。该酶激活后可以诱导产生O<sup>2-</sup>, 该O<sup>2-</sup>能够与细胞内的NO反应从而降低NO的生物利用度, 并产生另一种活性氧自由基ONOO<sup>-</sup>, 该自由基可以氧化BH<sub>4</sub>成BH<sub>2</sub>, 导致一氧化氮合酶NOS解偶联。NOS解偶联可以通过影响NO的活性及合成, 从而调控cGMP的形成。PDE: 磷酸二酯酶; PKG: 蛋白激酶G; PKC: 蛋白激酶C; GTP: 鸟苷三磷酸。

When the external stimulating factors such as Ang II combine with the corresponding membrane receptor, the intracellular NADPH oxidase subunit is induced and transferred across the membrane and assembled with relevant subunits to form and activate NADPH oxidase (NOX), and induce O<sup>2-</sup> production. Subsequently, O<sup>2-</sup> would reduce the bioavailability of NO in the cell, while another reactive oxygen species of ONOO<sup>-</sup> produced, which can oxidize BH<sub>4</sub> into BH<sub>2</sub>, uncoupling the nitric oxide synthase, and affecting the activity and content of intracellular NO, thereby affecting the formation of cGMP<sup>[2-3]</sup>. PDE: phosphodiesterase; PKG: protein kinase G; PKC: protein kinase C; GTP: guanosine triphosphate.

图1 NOS和NO信号通路的串话<sup>[10]</sup>

Fig.1 Crosstalks between NOS and NO signaling pathways<sup>[10]</sup>

实, NO主要是由NOS以L-精氨酸(L-Arginine)为底物合成的, 这一反应需要 $O_2$ 和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)的参与, 另外还产生L-瓜氨酸(L-Citrulline)。L-精氨酸具有严格的主体结构专一性。虽然鸟苷酸环化酶(guanine nucleotide, GC)有多种, 但仅sGC才可作为NO的靶酶, 即可溶性鸟苷酸环化酶, 生成环鸟苷酸<sup>[9]</sup>(图1)。

cGMP是一种具有细胞内信息传递作用的第二信使(second messenger), 可被G蛋白偶联受体(G-protein linked receptor)激活的蛋白激酶(protein kinases)所活化<sup>[11]</sup>, 进而将胞外信号转导至细胞核, 是一种具有广泛生物学活性的环核苷酸。它在视觉、嗅觉、代谢、肌肉收缩、神经传递、胞吐作用、细胞生长和分化等生理过程中起重要作用<sup>[12-13]</sup>。NO可通过cGMP途径及多种非cGMP依赖性途径调节卵巢中功能蛋白的表达。

## 2.2 NO/cGMP信号通路对细胞凋亡的影响

卵泡闭锁(follicle atresia)是指卵泡发育过程中发生退化并最终被清除的生理现象。目前已有众多研究证实, NO/cGMP信号通路可通过影响颗粒细胞的成熟参与细胞凋亡。Basini等<sup>[14]</sup>于1998年发现, 小卵泡的颗粒细胞中高水平的NO会抑制细胞的凋亡, 而大卵泡的颗粒细胞中低水平的NO可促进细胞凋亡的效应, 随后, 2000年Basini等<sup>[15]</sup>又发现, 低浓度NO对猪的颗粒细胞有减少其细胞凋亡的作用。在水牛颗粒细胞中, 加入SNP(sodium nitroprusside, NO供体), 在较高浓度( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  mol/L)时具有较强的细胞毒性, 导致细胞凋亡, 但是在较低及合适的浓度( $10^{-9}$  mol/L)时可以促进颗粒细胞的生长<sup>[16]</sup>。除此之外, 在小鼠未发育卵泡和排卵前卵泡颗粒细胞中, NO浓度的高低也对其具有保护作用<sup>[17]</sup>。利用cGMP类似物处理腔前卵泡或排卵前卵泡可以阻止凋亡<sup>[18-19]</sup>。这些结果表明, 卵巢内NO及第二信使cGMP在调控卵泡存活机制中具有重要作用, 尤其是细胞中NO的浓度对于卵泡颗粒细胞的生存与凋亡具有重要的意义。

Chen等<sup>[20]</sup>报道在大鼠的卵巢颗粒细胞中, Fas/FasL凋亡系统通过激活半胱氨酸蛋白酶(caspase)来诱导细胞凋亡时, 常伴随iNOS表达的降低。他们推测NO通过抑制caspase, 从而抑制Fas/FasL系统诱导细胞凋亡。另外, Wang等<sup>[21]</sup>研究发现, NO不仅可以降低由FSH刺激诱发的抑制素分泌, 还可以有效地

抑制卵泡发育过程中卵巢细胞的凋亡与卵泡的闭锁。由此可见, NO在卵巢颗粒细胞中可以通过与Fas/FasL凋亡系统的复杂对话调控颗粒细胞的生长及凋亡, 并可以介导卵巢激素的分泌进而调控卵巢细胞的凋亡与卵泡的闭锁。由此可见, NO信号通路可以调控细胞凋亡机制。

## 3 NOS对卵泡发育的影响

研究发现, 敲除eNOS的成熟雌小鼠与正常的小鼠相比, 表现出发情周期的延长, hCG诱导的排卵率降低, 卵巢形态学发生异常, 胚胎数降低, 类固醇激素合成障碍以及死胎率更高、胎儿的个体更小<sup>[22-23]</sup>。另有研究发现, eNOS不仅存在于大鼠卵巢颗粒细胞、基质细胞、膜细胞、黄体细胞及血管中, 在猪的颗粒细胞中也存在<sup>[24]</sup>。iNOS可在大鼠卵巢初级卵泡至小有腔卵泡颗粒细胞、基质细胞、膜细胞和黄体细胞中表达<sup>[25]</sup>, 提示eNOS和iNOS可能都参与卵巢内NO的生成。敲除*nNOS*基因的雌性小鼠(*nNOS*<sup>-/-</sup>)表现出卵母细胞破裂位点, 但是减少的卵母细胞数可以通过注射促性腺激素来恢复<sup>[26]</sup>。我们由此可以猜测, 在卵巢卵泡发育中eNOS和iNOS起着重要的作用, 而nNOS的表达可能存在种属特异性, 其在卵巢卵泡发育中的作用还有待研究。通过对大鼠出生到初情期之前的卵巢NOS三种亚型的表达和定位发现, 卵巢中NO的浓度和总NOS活性主要由eNOS和iNOS贡献, 而不是nNOS<sup>[27]</sup>。我们对新生及性成熟前母猪卵巢NOS三种亚型的定位研究也与此相一致<sup>[28]</sup>。

我们采用组织学观察, 分析统计不同处理组卵泡发育的动力学变化, 发现NOS的三个亚型主要定位于各阶段卵泡的卵母细胞中, 并随着颗粒细胞和卵泡膜细胞的生长逐步增加<sup>[27]</sup>, 说明NOS可能参与了新生雌性大鼠的卵巢卵泡发育, 并且有促进卵泡提早发育的功能。卵泡颗粒细胞、膜细胞和卵母细胞中eNOS的表达也提示eNOS的功能所在。随着卵泡的发育, 亚硝酸盐/硝酸盐(NO的代谢产物)在循环系统中的水平增加, 含量与卵泡大小成正相关, 这说明在卵泡及卵母细胞发育中NO起着重要的作用<sup>[29]</sup>, 并有可能促进卵泡的发育。此外, 本实验室还通过免疫组织化学分析凋亡标记蛋白(caspase-3)和自噬标记蛋白(LC3), 发现大鼠出生5天后, caspase-3及LC3在卵巢颗粒细胞、卵母细胞、膜细胞等普遍分布。这

也与国外一些学者的研究相一致<sup>[30]</sup>, 说明NOS不仅参与了新生雌性大鼠的卵巢卵泡发育, 还参与了细胞自噬与凋亡以促进卵泡的提早发育。

Matsumi等<sup>[31]</sup>发现, 所有闭锁卵泡颗粒细胞中都检测不到iNOS活性, 而大多数不成熟的大鼠卵泡颗粒细胞中存在iNOS。当在组织培养的大鼠颗粒细胞中加入NO供体SNAP(S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine)可直接抑制颗粒细胞的自然凋亡, 说明在不成熟的大鼠卵泡颗粒细胞中, iNOS产生的NO可能通过抑制颗粒细胞的凋亡来阻止大鼠卵泡闭锁。Faletti等<sup>[32]</sup>证明, 在体外, NOS抑制剂L-NAME(NG-nitro-L-arginine methyl ester)能抑制大鼠卵巢产生前列腺素E(PGE)及前列腺素F<sub>2α</sub>(PGF<sub>2α</sub>), 而NO供体SIN-1能刺激PGE及PGF<sub>2α</sub>的表达。说明iNOS可能通过环氧合酶通路刺激PGE及PGF<sub>2α</sub>的表达, 进而刺激卵泡破裂。另外, NO还可以通过调节促性腺激素释放激素(GnRH)的分泌来调节促黄体素(LH)的分泌, 并调节卵巢类固醇的生成。由于NO可以调节血管的紧张度<sup>[33]</sup>, 所以NO可能通过调节脑下垂体门脉血流, 间接影响激素的释放, 从而影响机体的排卵、颗粒细胞凋亡和卵泡破裂等。

本实验室曾利用新生大鼠卵巢模型研究了环鸟苷酸(cyclic guanylic acid, cGMP)与环鸟苷酸-磷酸二酯酶(cGMP-PDE)在卵巢卵泡启动中的作用。结果显示, 第二信使cGMP水平的升高与卵巢卵泡的发育及颗粒细胞的增殖一致, 也表明NO/cGMP通路可能参与卵泡生长的启动<sup>[27]</sup>。另一方面, 高浓度NO会造成细胞凋亡, 通过产生大量的超氧化物, 或者通过细胞凋亡的多个途径对细胞产生毒害。但NO在一个合适的浓度时, 又会通过cGMP途径抗凋亡, 抑制卵泡闭锁<sup>[34]</sup>。

#### 4 展望

NO作为一种重要的气体信号分子在生殖生理过程中起着非常广泛的调节作用, 如介导卵泡闭锁, 卵泡颗粒细胞的生长和凋亡、生殖激素的合成、卵泡的生长和成熟等。作为NO生成中的关键酶, NOS越来越受到大家的重视, 目前的研究已经表明NOS参与了新生雌性大鼠的卵巢卵泡发育, 并且有促进卵泡提早发育的功能。研究结果已经表明, 第二信使cGMP水平的升高与卵巢卵泡的发育及颗粒细胞的增殖是一致的, 说明NO/cGMP信号通路参与卵泡

生长的启动<sup>[27]</sup>。为进一步研究卵泡发育机制提供了新的研究方向, 并为相关疾病的治疗和临床应用提供了新思路 and 途径。尽管如此, 诸如内源性NO及相关的NOS三种亚型的精确调节机制等许多问题还亟待解决。

#### 参考文献 (References)

- 1 沈政, 铁国栋, 赵兴绪, 段恩奎. 雌性动物生殖系统中的一氧化氮. 细胞生物学杂志(Shen Zheng, Tie Guodong, Zhao Xingxu, Duan Enkui. The role of nitric oxide in female reproduction. Chinese Journal of Cell Biology) 2004; 26(4): 349-51.
- 2 周振琪, 潘玲梅, 王恬, 石放雄. 环鸟苷酸对卵巢细胞功能的调控. 细胞生物学杂志(Zhou Zhenqi, Pan Lingmei, Wang Tian, Shi Fangxiong. Regulation of ovarian function by cGMP. Chinese Journal of Cell Biology) 2005; 27(6): 603-6.
- 3 潘玲梅, 周振琪, 王恬, 石放雄. 一氧化氮对动物卵巢细胞中功能蛋白基因表达的调节. 家畜生态学报(Pan Lingmei, Zhou Zhenqi, Wang Tian, Shi Fangxiong. Regulation of functional proteins by nitric oxide in the ovary. J Domestic Anim Ecol) 2006; 27(2): 92-6.
- 4 Basini G, Bussolati S, Santini SE, Grasselli F. The impact of the phyto-oestrogen genistein on swine granulosa cell function. J Anim Physiol Anim Nutr 2010; 94(6): 374-82.
- 5 Heydarpour P, Salehi-Sadaghiani M, Javadi-Paydar M, Rahimian R, Fakhfour G, Khosravi M, et al. Estradiol reduces depressive-like behavior through inhibiting nitric oxide/cyclic GMP pathway in ovariectomized mice. Horm Behav 2013; 63(2): 361-9.
- 6 Okhotin VE, Shuklin AV. Significance of neuronal, endothelial and inducible NO-synthase isoforms in the cardiac muscle histophysiology. Morfologiya 2006; 129(1): 7.
- 7 Vodovotz Y, Russell D, Xie QW, Bogdan C, Nathan C. Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. J Immunol 1995; 154(6): 2914-25.
- 8 Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. Biochem J 2001; 357(5): 593.
- 9 Kastrati I, Edirisinghe PD, Wijewickrama GT, Thatcher GR. Estrogen-induced apoptosis of breast epithelial cells is blocked by NO/cGMP and mediated by extranuclear estrogen receptors. Endocrinology 2010; 151(12): 5602-16.
- 10 吴艳青, 陈丽云, 黄晓红, 王正朝. HIF-NOS信号通路对哺乳动物卵巢NO依赖性功能的调控作用. 中国生物化学与分子生物学报(Wu Yanqing, Chen Liyun, Huang Xiaohong, Wang Zhengchao. Regulatory effects of HIF-NOS signaling pathway on NO-dependent functions in mammalian ovary. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology) 2012; V28(4): 297-303.
- 11 朱亮, 章孝荣, 刘亚, 陶勇. 一氧化氮与卵母细胞发育. 动物医学进展(Zhu Liang, Zhang Xiaorong, Liu Ya, Tao Yong. Effects of nitric oxide on the oocyte development. Progress in Veterinary Medicine) 2010; 31(2): 107-10.
- 12 Marathe N, Rangaswami H, Zhuang S, Boss GR, Pilz RB. Pro-survival effects of 17β-estradiol on osteocytes are mediated by nitric oxide/cGMP via differential actions of cGMP-dependent protein kinases I and II. J Biol Chem 2012; 287(2): 978-88.
- 13 Zaccolo M, Movsesian MA. cAMP and cGMP signaling crosstalk: Role of phosphodiesterases and implications for cardiac

- pathophysiology. *Circ Res* 2007; 100(11): 1569-78.
- 14 Basini G, Baratta M, Ponderato N, Bussolati S, Tamanini C. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? *Reprod Fertil Dev* 1998; 10(6): 471-8.
- 15 Basini G, Grasselli F, Ponderato N, Bussolati S, Tamanini C. Lipid hydroperoxide and cGMP are not involved in nitric oxide inhibition of steroidogenesis in bovine granulosa cells. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12(5/6): 289-95.
- 16 Dubey PK, Tripathi V, Singh RP, Sastry KV, Sharma GT. Influence of nitric oxide on steroid synthesis, growth and apoptosis of Buffalo granulosa cells *in vitro*. *J Anim Sci* 2011; 24: 1204-10.
- 17 Matsumi H, Yano T, Osuga Y, Kugu K, Tang X, Xu JP, *et al*. Regulation of nitric oxide synthase to promote cytotaxis in ovarian follicular development. *Biol Reprod* 2000; 63(1): 141-6.
- 18 Chen Q, Yano T, Matsumi H, Osuga Y, Yano N, Xu J, *et al*. Cross-talk between Fas/Fas ligand system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis: A possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 2005; 146(2): 808-15.
- 19 Preuthippan S, Chen SH, Tilly JL, Kugu K, Lareu RR, Dharmarajan AM. Inhibition of nitric oxide synthesis potentiates apoptosis in the rabbit corpus luteum. *Reprod Biomed Online* 2004; 9(3): 264-70.
- 20 Chen Q, Yano T, Matsumi H, Osuga Y, Yano N, Xu J, *et al*. Cross talk between Fas/Fas ligand system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis: A possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 2005; 146(2): 808-15.
- 21 Wang ZC, Shi FX. Phosphodiesterase 4 and compartmentalization of cyclic AMP signaling. *Chin Sci Bull* 2007; 52(1): 34-46
- 22 Pallares P, Garcia-Fernandez RA, Criado LM, Letelier CA, Esteban D, Fernandez-Toro JM, *et al*. Disruption of the endothelial nitric oxide synthase gene affects ovulation, fertilization and early embryo survival in a knockout mouse model. *Reproduction* 2008; 136(5): 573-9.
- 23 Bryant CE, Tomlinson A, Mitchell JA, Thiernemann C, Willoughby DA. Nitric oxide synthase in the rat fallopian tube is regulated during the oestrous cycle. *J Endocrinol* 1995; 146(1): 149-57.
- 24 Kim H, Moon C, Ahn M, Lee Y, Kim H, Kim S, *et al*. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *J Vet Sci* 2005; 6(2): 97-101.
- 25 Zackrisson U, Mikuni M, Wallin A, Delbro D, Hedin L, Brannstrom M. Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum Reprod* 1996; 11(12): 2667-73.
- 26 Drazen DL, Klein SL, Burnett AL, Wallach EE, Crone JK, Huang PL, *et al*. Reproductive function in female mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 1999; 3(5): 366-74.
- 27 Zhang W, Wei QW, Wang ZC, Ding W, Shi FX. Cell-specific expression and immunolocalization of nitric oxide synthase isoforms and the related nitric oxide/cyclic GMP signaling pathway in the ovaries of neonatal and immature rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011; 12(1): 55-64.
- 28 Ding W, Zhang W, Hui FM, Zhang YH, Zhang FF, Li XM, *et al*. Cell-specific expression and immunolocalization of nitric oxide synthase isoforms and soluble guanylyl cyclase  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  subunits in the ovary of fetal, neonatal and immature pigs. *Anim Reprod Sci* 2012; 131(3/4): 172-80.
- 29 常红, 杨增明. 一氧化氮合酶与雌性生殖. *生殖与避孕 (Chang Hong, Yang Zengming. NOS and female reproduction. Reproduction & Contraception)* 2001; 21(3): 131-7.
- 30 Choi JY, Jo MW, Lee EY, Yoon BK, Choi DS. The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells. *Fertil Steril* 2010; 93(8): 2532-7.
- 31 Matsumi H, Koji T, Yano T, Yano N, Tsutsumi O, Momoeda M, *et al*. Evidence for an inverse relationship between apoptosis and inducible nitric oxide synthase expression in rat granulosa cells: A possible role of nitric oxide in ovarian follicle atresia. *Endocr J* 1998; 45(6): 745-51.
- 32 Faletti A, Perez Martinez S, Perotti C, de Gimeno MA. Activity of ovarian nitric oxide synthase (NOs) during ovulatory process in the rat: Relationship with prostaglandins (PGs) production. *Nitric Oxide* 1999; 3(4): 340-7.
- 33 Chatterjee S, Collins TJ, Yallampalli C. Inhibition of nitric oxide facilitates LH release from rat pituitaries. *Life Sci* 1997; 61(1): 45-50.
- 34 Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 1999; 19(84): 253-6.