

文章编号: 1004-0374(2009)04-0494-05

· 评述与综述 ·

## 卵泡颗粒细胞凋亡相关蛋白的研究进展

王昭晖, 张耀君, 师红, 文瑞丽, 吴民耀\*

(陕西师范大学生命科学学院, 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室,  
西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 西安 710062)

**摘要:** 哺乳动物的卵巢中存在大量卵泡。大多数卵泡在发育过程中发生闭锁而消失, 只有少数可以发育到成熟而排卵。卵泡是由卵母细胞与其周围的颗粒细胞构成的。卵泡颗粒细胞的凋亡是卵泡闭锁的主要原因。颗粒细胞凋亡相关蛋白通过参与凋亡通路及凋亡信号转导调节凋亡。本文就哺乳动物卵泡颗粒细胞凋亡相关蛋白的研究进展进行综述。

**关键词:** 卵泡; 凋亡蛋白; 颗粒细胞凋亡

**中图分类号:** R321.1 **文献标识码:** A

## Recent research on apoptosis-associated proteins of follicular granulosa cells

WANG Zhao-hui, ZHANG Yao-jun, SHI Hong, WEN Rui-li, WU Min-yao\*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry,  
National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, College  
of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** There are a large amount of follicles in mammalian ovary. Most of the follicles undergo atresia during the process of follicular development and then disappear, only a few of them mature and ovulate. Ovarian follicles are consisted with oocytes and the granulosa cells around them. The apoptosis of granulosa cells is the main reason for follicle atresia. Apoptosis-associated proteins regulate apoptosis through taking part in the apoptosis pathway and the signal transduction in apoptosis. This review focuses the recent researches on the proteins which regulate the process of the apoptosis of follicular granulosa cells.

**Key words:** follicle; apoptosis protein; granulosa cells apoptosis

细胞凋亡(apoptosis)是一种细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)的过程,在生物体中普遍存在,发生于各种生理过程中。在哺乳动物的卵巢中,多于99%的卵泡在生长过程中退化闭锁,只有极少数能发育成熟,最终排卵。卵泡颗粒细胞发生凋亡是卵泡闭锁的主要原因<sup>[1]</sup>。颗粒细胞凋亡途径主要有两条:死亡受体途径和线粒体途径。它们都是由相关蛋白质的调节来实现的。死亡受体途径起始于死亡受体及配体的结合,参与线粒体途径的蛋白主要是Bcl-2家族。caspase家族可参与死亡受体途径与线粒体途径。X连锁凋亡抑制蛋白(X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, XIAP)则通过选择性地抑制caspase活性及参与凋亡通路抑制

细胞凋亡,细胞型FLICE样抑制蛋白(cellular FLICE-like inhibitory protein, cFLIP)能抑制死亡受体介导的细胞凋亡。

### 1 死亡受体及配体

死亡受体属于肿瘤坏死因子受体超家族(tumor necrosis factor receptor superfamily, TNFRsf),主要包括:Fas、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)。

收稿日期: 2009-03-26; 修回日期: 2009-04-14

基金项目: 陕西师范大学“211工程”重点项目(884067)

\*通讯作者: E-mail: minyaowu@snnu.edu.cn

与之对应的死亡配体为: FasL、TNFRs 和 TRAILRs。死亡受体位于细胞膜, 有相似的富含半胱氨酸的胞外结构域和具有水解蛋白功能的胞内同源氨基酸残基, 称为死亡区域(death domain, DD), 在传递凋亡信号中发挥关键性作用。

**1.1 Fas/FasL蛋白** Fas是相对分子质量为45 k的跨膜蛋白, 分布于心、脑、肠、睾丸和卵巢等组织。Fas与FasL蛋白结合引发Fas凋亡通路。FasL与Fas形成三聚体相互结合, 胞内Fas结合蛋白(fas-associated death domain, FADD)C端含死亡区域, N端含死亡效应区域(death effector domain, DED)。Fas与FADD的DD同源结合, procaspase-8形成二聚体与FADD的DED同源结合, 构成死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC)。procaspase-8诱导自身蛋白酶水解成有活性的caspase-8, 活化下游凋亡途径。在非线粒体依赖途径中激活caspase-3。在线粒体依赖途径中caspase-8将Bid切割成片段t-Bid, 使细胞线粒体释放细胞色素氧化酶C。细胞色素氧化酶C与caspase-9和凋亡激活酶因子Apaf-1(apoptotic protease-activating factor 1)结合形成凋亡体, 激活caspase-3。caspase-3活化后可以降解ICAD/DFP-45, 释放出CAD, 使其进入细胞核导致凋亡。在牛<sup>[2]</sup>、大鼠<sup>[3]</sup>、小鼠<sup>[4]</sup>和猪<sup>[5]</sup>的卵巢中已检测出Fas和FasL蛋白。Vickers等<sup>[2]</sup>研究发现在牛卵巢的闭锁卵泡中, FasL蛋白在卵泡膜表达, 而Fas蛋白在颗粒细胞层表达。Kim等<sup>[3]</sup>发现Fas蛋白在大鼠卵巢的表达是在颗粒细胞中, 而FasL蛋白的表达是在卵母细胞中, 颗粒细胞的FasL与卵母细胞的FasL结合, 引起颗粒细胞凋亡, 导致卵泡的闭锁。Dharma等<sup>[4]</sup>的研究结果表明在小鼠卵巢中, FasL蛋白在颗粒细胞中表达, Fas蛋白在卵母细胞中表达, 他们认为小鼠卵巢卵母细胞的凋亡可能是被颗粒细胞诱导的。Inoue等<sup>[5]</sup>在猪的健康卵泡颗粒细胞中检测到FasL蛋白和其mRNA表达, 但表达水平很低, 而且其表达的量随着卵泡的闭锁程度的加重而增加, Fas蛋白和其mRNA在健康卵泡的颗粒细胞中表达量更低, Fas蛋白的表达位于胞质而不是细胞膜区域。Fas和FasL蛋白在卵巢中的表达和定位有物种的特异性, 这种特异性揭示了颗粒细胞在不同物种中凋亡机制是不同的。

**1.2 TNF- $\alpha$ /TNFRs** TNF- $\alpha$ 又叫肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), 是由巨噬细胞、单核细胞产生的一种多肽类的细胞因子, 其基因表达产物

先生成233个氨基酸残基组成的前体, 其中含有76个氨基酸残基的信号肽, 切除信号肽后才能转化成有活性的TNF。TNF- $\alpha$ 有两种死亡受体: 含有DD的TNFR1和不含DD的TNFR2。TNF- $\alpha$ 通过与不同的受体结合来实现对细胞死亡和增殖的诱导调节。TNF- $\alpha$ 先与TNFR1结合, TNFR1再与TNFR1胞内结合蛋白(tumor necrosis factor receptor 1 associated death domain, TRADD)的DD同源区结合, 若与FADD同源区结合则激活procaspase-8, 启动促进凋亡通路。TNFR1也可通过TRADD间接与含死亡区域的受体相互作用蛋白(receptor-interacting protein, RIP)结合, 促进RIP与肿瘤坏死因子受体相关因子2(TNF receptor associated factor 2, TRAF2)相互作用, 激活I $\kappa$ B磷酸化激酶(I $\kappa$ B kinase- $\beta$ , IKK- $\beta$ )的活性, 后者又诱导NF- $\kappa$ B的抑制物I $\kappa$ B(inhibitory protein of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B)发生磷酸化, 使NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B二聚体解离, 活化NF- $\kappa$ B, 启动抑制凋亡通路。TNFR2与TRAF2在细胞内结合后也能活化NF- $\kappa$ B的细胞凋亡抑制途径。TNF- $\alpha$ 是猪卵泡发育的维持因子, Nakayama等<sup>[6]</sup>的研究显示在猪健康卵泡的颗粒细胞层中可检测出TRAF2的mRNA, 且该蛋白表达显著, 而在闭锁卵泡中, TRAF2蛋白和其mRNA在颗粒细胞层的表达量下降, 颗粒细胞凋亡。

**1.3 TRAIL/TRAILRs** TRAIL是肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand), 又称凋亡素配体(APO2L)。人的TRAIL基因定位于染色体3q26上, cDNA全长1.05kb, 编码281个氨基酸, 相对分子质量为32.5k的跨膜蛋白。目前发现TRAIL受体有五种: 两种死亡受体(DR4和DR5)和两种诱骗受体(DcR1和DcR2), 以及可溶性受体骨保护素(osteoprotegerin, OPG)。DR4和DR5的胞内部分都含有功能性死亡区域, 与TRAIL结合后能抑制颗粒细胞凋亡结合后能促进颗粒细胞凋亡, 而DcR1和DcR2胞内部分缺乏功能性死亡区域, 与TRAIL结合后不介导凋亡。TRAIL参与细胞增殖和凋亡的调节: 死亡受体的TRADD与FADD死亡区域同源结合, FADD激活procaspase-8的活性, 促进颗粒细胞凋亡。死亡受体与含死亡区域的RIP结合可活化NF- $\kappa$ B, 抑制颗粒细胞凋亡。Inoue等<sup>[7]</sup>研究表明在猪卵泡颗粒细胞中TRAIL与配体结合后通过活化与受体结合后通过活化procaspase-8进而激活caspase-3诱导颗粒细胞的凋亡。Wada等<sup>[8,9]</sup>发现在猪健康卵泡中, DcR1对

TRAIL的亲和力比对死亡受体的亲和力强, TRAIL与DcR1结合, 抑制了卵泡颗粒细胞的凋亡, 但将DcR1从体外培养的猪颗粒细胞膜移除后, TRAIL与死亡受体结合导致了颗粒细胞凋亡。他们还在猪的闭锁卵泡中检测到了TRADD的mRNA的表达, 证明了TRAIL凋亡通路参与了猪闭锁卵泡中颗粒细胞的凋亡<sup>[10]</sup>。

## 2 Bcl-2家族

Bcl-2家族成员都含有1—4个同源结构域(BH1—4), 其中BH4是抗凋亡蛋白所特有的结构域, BH3是与促进凋亡有关的结构域。Bcl-2蛋白家族可分为促凋亡的蛋白(如Bax、Bak、Bad和Bid)和抗凋亡蛋白(如Bcl-2、Bcl-x1和Bcl-w)。Bcl-2蛋白家族参与颗粒细胞凋亡的线粒体通路, 定位于线粒体膜, 通过调节线粒体膜电位和线粒体膜的通透性来调控细胞凋亡<sup>[11]</sup>。实验表明, Bcl-2蛋白家族中的Bcl-2蛋白与Bax蛋白在卵泡颗粒细胞凋亡中起着重要的作用。研究发现, 在*bcl-2*基因缺失的小鼠模型中, 卵泡数量下降, *bcl-2*基因过量表达的小鼠卵泡颗粒细胞的凋亡和卵泡的闭锁被抑制<sup>[12, 13]</sup>。*bax*基因缺失小鼠的颗粒细胞数目远多于正常小鼠卵泡中颗粒细胞的数量<sup>[14]</sup>。当人的卵巢颗粒细胞的凋亡被皮质激素抑制时, 细胞内*bcl-2*基因表达增高, 证明了Bcl-2蛋白能抑制颗粒细胞的凋亡, 促进卵泡的生长和排卵<sup>[15]</sup>。*bax*基因有促进早期闭锁卵泡颗粒细胞凋亡的作用, Bax蛋白在人的早期闭锁卵泡的颗粒细胞中大量表达, 而在正常卵泡或完全闭锁的卵泡中却几乎不表达<sup>[16]</sup>。在大鼠黄体发育过程中, *bcl-2*基因表达明显升高, 而*bax*基因在退化的黄体中表达明显, 这表明在大鼠卵泡发育过程中, *bcl-2*和*bax*基因分别参与了颗粒细胞的增殖和凋亡的调控<sup>[17]</sup>。

## 3 caspase家族

caspase家族是一组存在于胞质溶胶中结构上相关的半胱氨酸蛋白酶, 在细胞中以酶原形式存在, 活化后可选择性地切割某些蛋白, 使其失活。参与诱导凋亡的caspase蛋白酶可分为两大类: 一类为启动酶, 包括参与线粒体凋亡途径的caspase-9和死亡受体途径激活的caspase-8; 另一类为效应酶, 包括caspase-3、-6和-7等<sup>[18]</sup>。猪卵泡颗粒细胞的凋亡是由线粒体途径引发, 在猪卵泡闭锁的过程中Apaf-1的mRNA表达量相对稳定, 其蛋白质表达水平也比较稳定; caspase-9的mRNA表达量增加, procaspase-9的蛋白只在健康卵泡的颗粒细胞中能被

检测出来, 并随卵泡的闭锁过程而被水解成有活性的caspase-9而表达量减少<sup>[19]</sup>。许多激素和生长因子对颗粒细胞凋亡的调节是通过抑制或激活caspase的活性来实现的。促性腺激素释放激素(GnRH-I、GnRH-II)与GnRH-I受体的作用, 通过活化caspase蛋白家族中caspase-8、-3和-7促进了人类颗粒细胞凋亡<sup>[20]</sup>。骨形成蛋白(BMPs)属TGF- $\beta$ 家族, 是卵泡在哺乳动物卵巢中发育的重要因子。BMP-4和BMP-7对颗粒细胞抑制凋亡的途径是不同的: BMP-7通过抑制caspase-9和caspase-3的活性来抑制颗粒细胞的凋亡, 而BMP-4并没有抑制caspase-3的活性, 而是通过抑制CAD从CAD/ICAD的释放来抑制凋亡<sup>[21]</sup>。血管内皮因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可抑制caspase-3的活性, 是颗粒细胞凋亡的维持因子, VEGF对*bax*和*bcl-x1*基因表达影响很小, 说明VEGF不是通过抑制线粒体途径抑制颗粒细胞的凋亡<sup>[22]</sup>, 同样的机制也表现在BMP-4和BMP-7对颗粒细胞凋亡的抑制<sup>[21]</sup>。

## 4 X连锁凋亡蛋白

X连锁凋亡蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)相对分子质量是57 k, 基因位于Xq25, 蛋白结构中N-端有3个BIR(baculoviral inhibitor of apoptosis repeat, BIR)结构域, C端有1个RING锌指(RING Zn finger)结构域。BIR结构域抑制caspase的活性, 发挥抗凋亡作用。XIAP抑制颗粒细胞凋亡的机制主要是选择性的抑制caspase-3、-7和-9的活性<sup>[23]</sup>, 参与细胞核因子NF- $\kappa$ B的调节<sup>[24]</sup>, 参与信号转导途径<sup>[25]</sup>。

用促性腺激素处理大鼠可抑制其颗粒细胞的凋亡, 并检测到XIAP蛋白的表达量增加, 卵泡可以发育到有腔卵泡期和排卵期<sup>[26]</sup>; 用马绒毛膜促性腺激素(equine choriogonadotrophin, eCG)预处理, 再用抗eCG抗体诱发大鼠卵巢细胞凋亡导致早期窦状卵泡及窦状卵泡的颗粒细胞凋亡, XIAP蛋白表达量下降, DNA裂解成有凋亡特征180—200bp的整数倍片段<sup>[26]</sup>。在猪健康卵泡的颗粒细胞中, XIAP的mRNA和蛋白高度表达, 其表达量随着卵泡闭锁的进程而下降, 在闭锁卵泡中表达量很少, 甚至不表达, XIAP抑制procaspase-9的活性并发挥对颗粒细胞的抗凋亡作用<sup>[27]</sup>。TNF- $\alpha$ 作为大鼠颗粒细胞体外培养的存活因子, 通过激活NF- $\kappa$ B通路来上调XIAP的表达进而抑制凋亡, 这提示XIAP是一类NF- $\kappa$ B相关的调控蛋白<sup>[24]</sup>。Asselin等<sup>[25]</sup>向大鼠颗粒

细胞培养体系注入含有 XIAP 正义链的腺病毒载体, 发现磷酸化蛋白激酶B (protein kinase B, PKB/Akt) 的表达量增加, 颗粒细胞凋亡被抑制, 当注入含有 XIAP 反义链的腺病毒载体时, 磷酸化 Akt 蛋白表达减少并促进细胞凋亡, 向培养体系中加入 PI3-K 的抑制剂 LY294002, 可导致磷酸化 Akt 蛋白的表达降低并诱导颗粒细胞的凋亡, 揭示了 XIAP 通过 PI3-K 通路来抑制颗粒细胞的凋亡。

## 5 细胞型 FLICE 样抑制蛋白

cFLIP 是 caspase-8 抑制蛋白, 分短构型 cFLIP<sub>S</sub> 和长构型 cFLIP<sub>L</sub> 两种构型。cFLIP 的 N 端含有 DED, 可与 FADD 结合, cFLIP<sub>S</sub> 只有 2 个 DED, 而 cFLIP<sub>L</sub> 除 2 个 DED 外, 还有 1 个伪酶活性区域<sup>[28]</sup>。cFLIP<sub>L</sub> 与 cFLIP<sub>S</sub> 都可被 FADD 招募至 DISC 上, 阻止 procaspase-8 的自我剪切和活化, 使 caspase 级联反应不能被触发, 因此, 抑制 Fas、TRAIL、TNF- $\alpha$  等具有 FADD 环节的死亡受体介导的细胞凋亡<sup>[29]</sup>。Fas 蛋白在猪健康卵泡颗粒细胞的定位证明 Fas 蛋白不参与颗粒细胞的凋亡<sup>[5]</sup>。在猪健康卵泡颗粒细胞中 cFLIP<sub>S</sub> 与 cFLIP<sub>L</sub> 的 mRNA 高度表达, 表明 cFLIP<sub>S</sub> 与 cFLIP<sub>L</sub> 能阻断 Fas 凋亡途径, 抑制了猪健康卵泡颗粒细胞的凋亡<sup>[30]</sup>。但 Matsuda-Minehata 等<sup>[31]</sup>在猪健康卵泡颗粒细胞中检测到的结果显示, 除了 cFLIP<sub>L</sub> 的 mRNA 和蛋白高表达外, cFLIP<sub>S</sub> 的 mRNA 和蛋白在卵泡发育过程中表达量低且变化不大, 故认为 cFLIP<sub>L</sub> 对猪卵泡颗粒细胞的抗凋亡作用较大。为了验证猪的 cFLIP<sub>S</sub> 和 cFLIP<sub>L</sub> 对卵泡颗粒细胞的抗凋亡作用, 他们向 JC-410 细胞系中注入猪 cFLIP 的 siRNA, 结果 cFLIP<sub>S</sub> 和 cFLIP<sub>L</sub> 的表达被抑制, 颗粒细胞生存能力显著下降<sup>[32]</sup>。Matsuda 等<sup>[33]</sup>向 KGN 细胞系中注入 cFLIP 的 siRNA, 抑制其蛋白的表达, 结果 procaspase-8 的活性增加, 引起颗粒细胞的凋亡, 加入 caspase-8 的抑制剂 Z-IETD-FMK 抑制了由 cFLIP 沉默引起的颗粒细胞的凋亡, 说明 cFLIP 可抑制 procaspase-8 的裂解和活化, 从而阻断由 Fas 通路引起的颗粒细胞凋亡。

## 6 小结与展望

颗粒细胞的凋亡是一个多因素参与的复杂过程, 凋亡相关蛋白通过参与凋亡途径中信号的转导来抑制或促进细胞凋亡。细胞凋亡可被两条不同的途径激活: 死亡受体途径和线粒体途径。死亡受体途径起始于死亡受体与配体的结合, 形成 DISC, 募集 procaspase-8 并自身裂解成有活性的 caspase-8

激活下游酶的级联反应。线粒体途径是由凋亡刺激因素诱导细胞色素 C 的释放并参与形成凋亡体。两条凋亡途径最终都激活 caspase-3, 活化 CAD 酶引起凋亡。caspase 家族既可参与线粒体途径又可参与死亡受体途径。XIAP 通过选择性地抑制 caspase 家族来调控颗粒细胞的凋亡。cFLIP 则主要通过阻断 Fas 通路来抑制颗粒细胞的凋亡, 但除 Fas 凋亡途径以外的作用机制及 cFLIP 的调节机制尚不清楚。颗粒细胞凋亡相关蛋白的调节机制还需要进一步的研究, 通过抑制颗粒细胞的凋亡可延缓卵泡闭锁, 治疗更年期综合征、提高体外授精和胚胎移植手术的成功率及推迟绝经期的到来延缓衰老, 更好地应用于人类生殖领域。

## [参 考 文 献]

- [1] Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, et al. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 1991, 129(5): 2799-801
- [2] Vickers SL, Cowan RG, Harman RM, et al. Expression and activity of the Fas antigen in bovine ovarian follicles cells. *Biol Reprod*, 2000, 62(1): 54-61
- [3] Kim JM, Yoon YD, Tsang BK. Involvement of the Fas/FasL system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology*, 1999, 140(5): 2307-17
- [4] Dharma SJ, Kelkar RL, Nandedkar TD. Fas and Fas ligand protein and mRNA in normal and atretic mouse ovarian follicles. *Reproduction*, 2003, 126(6): 783-9
- [5] Inoue N, Maeda A, Matsuda-Minehata F, et al. Expression and localization of Fas ligand and Fas during atresia in porcine ovarian follicles. *J Reprod Dev*, 2006, 52(6): 723-30
- [6] Nakayama M, Manabe N, Inoue N, et al. Changes in the expression of tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$ , TNF- $\alpha$  receptor (TNFR) 2, and TNFR-associated factor 2 in granulosa cells during atresia in pig ovaries. *Biol Reprod*, 2003, 68(2): 530-5
- [7] Inoue N, Manabe N, Matsui T, et al. Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling pathway in granulosa cell apoptosis during atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev*, 2003, 49(4): 313-21
- [8] Wada S, Manabe N, Inoue N, et al. TRAIL-decoy receptor-1 disappears in granulosa cells of atretic follicles in porcine ovaries. *J Vet Med Sci*, 2002, 48(2): 167-73
- [9] Wada S, Manabe N, Inoue N, et al. TRAIL-decoy receptor-1 plays inhibitory role in apoptosis of granulosa cells from pig ovarian follicles. *J Vet Med Sci*, 2002, 64(5): 435-9
- [10] Wada S, Manabe N, Inoue N, et al. TRADD is involved in apoptosis induction in granulosa cells during atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev*, 2002, 48(2): 175-81
- [11] Luetjens CM, Bui NT, Sengpiel B, et al. Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *J*

- Neurosci, 2000, 20(15): 5715-23
- [12] Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, et al. Ablation of *bcl-2* gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology*, 1995, 136(8): 3665-8
- [13] Hsu SY, Lai RJ, Finegold M, et al. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. *Endocrinology*, 1996, 137(11): 4837-43
- [14] Sasson R, Tajima K, Amsterdam A. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. *Endocrinology*, 2001, 142(2): 802-11
- [15] Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, et al. Analysis of apoptosis and expression of *bcl-2* gene family members in the human and baboon ovary. *Cell Death Differ*, 1998, 5(1): 67-76
- [16] Perez GI, Robles R, Knudson CM, et al. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat Genet*, 1999, 21(2): 200-3
- [17] Gürsoy E, Ergin K, Basaloglu H, et al. Expression and localisation of Bcl-2 and Bax proteins in developing rat ovary. *Res Vet Sci*, 2008, 84(1): 56-61
- [18] Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev*, 2003, 193: 10-21
- [19] Matsui T, Manabe N, Goto Y, et al. Expression and activity of Apaf1 and caspase-9 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *Reproduction*, 2003, 126(1): 113-20
- [20] Hong IS, Cheung AP, Leung PC. Gonadotropin-releasing hormones I and II induce apoptosis in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(8): 3179-85
- [21] Kayamori T, Kosaka N, Miyamoto A, et al. The differential pathways of bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 in the suppression of the bovine granulosa cell apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 2009, 323(1-2): 161-8
- [22] Kosaka N, Sudo N, Miyamoto A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(3): 733-7
- [23] Sun C, Cai M, Meadows RP, et al. NMR structure and mutagenesis of the third BIR domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem*, 2000, 275(43): 33777-81
- [24] Xiao CW, Ash K, Tsang BK. Nuclear factor- $\kappa$ B-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis. *Endocrinology*, 2001, 142(2): 557-63
- [25] Asselin E, Wang Y, Tsang BK. X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development. *Endocrinology*, 2001, 142(6): 2451-7
- [26] Li J, Kim JM, Liston P, et al. Expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia. *Endocrinology*, 1998, 139(3): 1321-8
- [27] Cheng Y, Maeda A, Goto Y, et al. Changes in expression and localization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in follicular granulosa cells during atresia in porcine ovaries. *J Reprod Dev*, 2008, 54(6): 454-9
- [28] Thome M, Schneider P, Hofmann K, et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, 1997, 386(6624): 517-21
- [29] Kim Y, Suh N, Sporn M, et al. An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2002, 277(25): 22320-9
- [30] Goto Y, Matsuda-Minehata F, Inoue N, et al. Porcine (*Sus scrofa*) cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP): molecular cloning and comparison with the human and murine cFLIP. *J Reprod Dev*, 2004, 50(5): 549-55
- [31] Matsuda-Minehata F, Goto Y, Inoue N, et al. Changes in expression of anti-apoptotic protein, cFLIP, in granulosa cell during follicular atresia in porcine ovaries. *Mol Reprod Dev*, 2005, 72(2): 145-51
- [32] Matsuda-Minehata F, Goto Y, Inoue N, et al. Anti-apoptotic activity of porcine cFLIP in ovarian granulosa cell lines. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(9): 1165-70
- [33] Matsuda F, Inoue N, Goto Y, et al. cFLIP regulates death receptor-mediated apoptosis in an ovarian granulosa cell line by inhibiting procaspase-8 cleavage. *J Reprod Dev*, 2008, 54(5): 314-20