

DOI: 10.13376/j.cbls/2019113

文章编号: 1004-0374(2019)09-0921-10

卵母细胞第一次减数分裂的阻滞和恢复

蔡 姣, 葛万文*

(兰州大学第二医院生殖医学中心, 兰州 730030)

摘要: 哺乳动物卵母细胞第一次减数分裂阻滞期间, 来自卵母细胞的 Gs-GPR-ADCY 诱导环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的生成, 升高卵母细胞内 cAMP 的水平。颗粒细胞中的 C 型利钠肽 (natriuretic peptides C, NPPC) 和肌昔 -5'-磷酸脱氢酶 (inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH) 调节卵丘颗粒细胞中环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 的生成, cGMP 进入卵母细胞抑制 cAMP-磷酸二酯酶 (cAMP-phosphodiesterase, cAMP-PDE) 活性, 升高 cAMP 浓度, 并使细胞质成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF) 处于非活化态, 最终诱导了减数分裂阻滞在双线期。促黄体素 (luteinizing hormone, LH) 峰的出现一方面降低了壁颗粒细胞中 NPPC 的水平, 另一方面激活了卵丘颗粒细胞丝裂原活化蛋白激酶 3/1 (mitogen-activated protein kinase 3/1, MAPK3/1), 两者均降低了卵母细胞中 cGMP 的浓度, 促进 cAMP 水解, 使得 MPF 处于活化态, 最终诱导了减数分裂恢复。该综述将探讨这两种环核苷酸如何通过阻断或启动减数分裂过程来调节卵母细胞成熟, 并对未来的研究提供一定的见解。

关键词: 减数分裂; 卵母细胞; 颗粒细胞; cAMP; cGMP

中图分类号: Q132.1 **文献标志码:** A

The first meiotic arrest and resumption in oocytes

CAI Jiao, GE Wan-Wen*

(Department of Reproductive Medicine, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China)

Abstract: During the first meiotic arrest of mammalian oocytes, the Gs-GPR-ADCY from oocytes stimulates the generation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and increases cAMP in oocytes. Natriuretic peptide precursor type C (NPPC) and inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) produced by granulosa cells stimulate the generation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), which diffuses into oocytes, inhibits cAMP-phosphodiesterase (cAMP-PDE) activity and maintains maturation promoting factor (MPF) as inactive. This inactivation results in the oocytes stop at the diplotene stage. The surge of luteinizing hormone (LH) decreases NPPC levels in mural granulosa cells and activates mitogen-activated protein kinase 3/1 (MAPK3/1) in cumulus granulosa cells. Both of them decrease intra-oocyte cGMP level, then result in hydrolyzation of cAMP. The reduction of cAMP ultimately activates oocyte MPF for the successful resumption of the meiosis. This review will discuss how these two cyclic nucleotides regulate oocyte maturation by blocking or initiating meiotic processes, and provide an insight into future research.

Key words: meiotic; oocyte; granulosa cell; cAMP; cGMP

卵母细胞第一次减数分裂起始于胎儿时期, 同源染色体联会和重组后, 减数分裂被阻滞在第一次减数分裂前期的双线期。依据物种不同, 卵母细胞双线期的阻滞时间长达数月或数年。阻滞在双线期的卵母细胞与周围单层扁平颗粒细胞一起形成了卵巢的基本单位, 即原始卵泡。每个月经 (人类) 或

发情 (动物) 周期开始时, 来自于垂体的促黄体素 (luteinizing hormone, LH) 诱导有限数量的原始卵泡

收稿日期: 2019-04-21; 修回日期: 2019-05-23

基金项目: 甘肃省青年科技基金计划(17JR5RA22B)

*通信作者: E-mail: 839266556@qq.com; Tel: 18215128205

发育成初级卵泡、腔前卵泡、窦卵泡并到达排卵前卵泡期。腔前卵泡发育至窦卵泡阶段, 封闭的卵母细胞逐渐获得恢复减数分裂的能力。从第一次减数分裂前期恢复的卵母细胞其形态学特征在于卵母细胞细胞核包膜的溶解, 通常称为“生发泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD)”。GVBD 和第一次减数分裂完成后, 卵母细胞进入第二次减数分裂, 并阻滞在第二次减数分裂中期直到受精。

1 卵母细胞第一次减数分裂阻滞

1.1 卵母细胞内信号在第一次减数分裂阻滞中的作用

1.1.1 cAMP水平的升高维持减数分裂的阻滞

哺乳动物窦卵泡中的体细胞包括卵泡膜细胞、壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞, 三者均可产生环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP), cAMP 进入卵母细胞维持成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF) 的非活性状态。失活的 MPF 导致卵母细胞阻滞在第一次减数分裂前期的双线期, 直到 LH 峰的出现。性激素或腺苷酸环化酶 (adenylyl cyclase, ADCY) 激活剂毛喉素的添加可以升高卵丘卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte-complexes, COCs) 中 cAMP 的水平^[1-2]。此外, 雌激素的作用不仅提高了壁颗粒细胞中 cAMP 的水平, 而且增加了缝隙连接的渗透性并改变了细胞外连接蛋白 43 (connexin43, Cx43) 的分布^[3], 而这两者被认为是将 cAMP 信号由卵泡体细胞传至卵母细胞的重要因素。

然而, 研究发现, 卵母细胞通过自身的 Gs-GPR-ADCY 级联反应也可产生 cAMP。动物体内 Gs 蛋白与受体结合激活 ADCY 是产生 cAMP 的前提。小鼠闭锁卵泡的卵母细胞中注射 Gs 抗体或 Gs 显性失活形式均导致了卵母细胞减数分裂的恢复^[4]。Gs 蛋白本身并没有活性, 卵母细胞膜上的 Gs 蛋白-偶联受体 3 (Gs protein-coupled receptor 3, GPR3) 是维持其活性的重要因素, GPR3 同时也维持了小鼠卵母细胞内高水平的 cAMP, 阻碍了减数分裂的进程^[5]。GPR3 敲除小鼠的卵母细胞在早期窦卵泡时期自发恢复了减数分裂, 而给卵母细胞注射 GPR3 mRNA 后逆转了这种现象^[5-6]。类似地, 生发泡 (germinal vesicle, GV) 到 MII 的猪卵母细胞中始终可以检测到 GPR3 的存在, 并在注射了 GPR3 特定的小干扰 RNA 后恢复了减数分裂; 反之, 卵母细胞注射 GPR3 mRNA 使 GPR3 过表达再次抑制了减数分裂恢复^[7]。猫卵母细胞中的研究也发现 GPR3

的上调升高了细胞内 cAMP 的水平, 高水平的 cAMP 抑制了减数分裂恢复^[8]。此外, 非洲爪蟾、大鼠和小鼠的卵母细胞中检测到另一个 GPR 家族成员——GPR12。非洲爪蟾卵母细胞中过表达的 GPR12 阻碍了孕酮诱导的减数分裂恢复^[9]。然而, 不同于 GPR3 的降低导致减数分裂的恢复, GPR12 缺陷的小鼠并没有表现出任何卵母细胞早熟的迹象^[10], 这就说明在小鼠卵母细胞中 GPR12 自身并不足以维持减数分裂的阻滞^[9-10]。

卵母细胞中, ADCY 是 Gs 蛋白引起 Gs 偶联受体活化后的效应酶。ADCY 主要负责催化三磷酸腺苷转化为 cAMP, 从而维持卵母细胞中高水平的 cAMP。小鼠和大鼠的卵母细胞中均可检测到 ADCY3, 而壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞中几乎检测不到 ADCY3 的 mRNA 和蛋白质表达^[11]。此外, ADCY3 缺陷型小鼠卵母细胞在体内表现出减数分裂阻滞的破坏, 在体外表现出卵母细胞自发成熟的加速^[11]。这些结果与两栖类动物卵母细胞中 ADCY 活性抑制后减数分裂恢复研究结果一致。然而, ADCY3 敲除小鼠既没有完全消除体内减数分裂阻滞, 也没有诱导体外卵母细胞的自发成熟, 这可能是由于其他一些 ADCY 成员, 如 ADCY1 和 ADCY9 的补偿作用。ADCY3 是大鼠体内唯一检测到的 ADCY 亚基, 而在小鼠体内可以检测到两种 ADCY 亚基^[11]。除了已知的 9 个经典的跨膜结合 ADCY, 2011 年, Tresguerres 等^[12]发现了一种可溶性腺苷酸环化酶 (soluble adenylyl cyclase, sADCY) 作为 cAMP 来源广泛存在于哺乳动物细胞内。不同于其他的膜结合 ADCYs 通过钙/钙调蛋白浓度来调节, sADCY 分布于整个细胞质和细胞器, 受碳酸氢根阴离子调节。近年来, sADCY 在雄性生殖细胞中的作用已被广泛研究, 而在卵母细胞中的作用尚未见报道, 因此 sADCY 在卵泡发育中的作用将是生殖领域未来研究的一大热点。

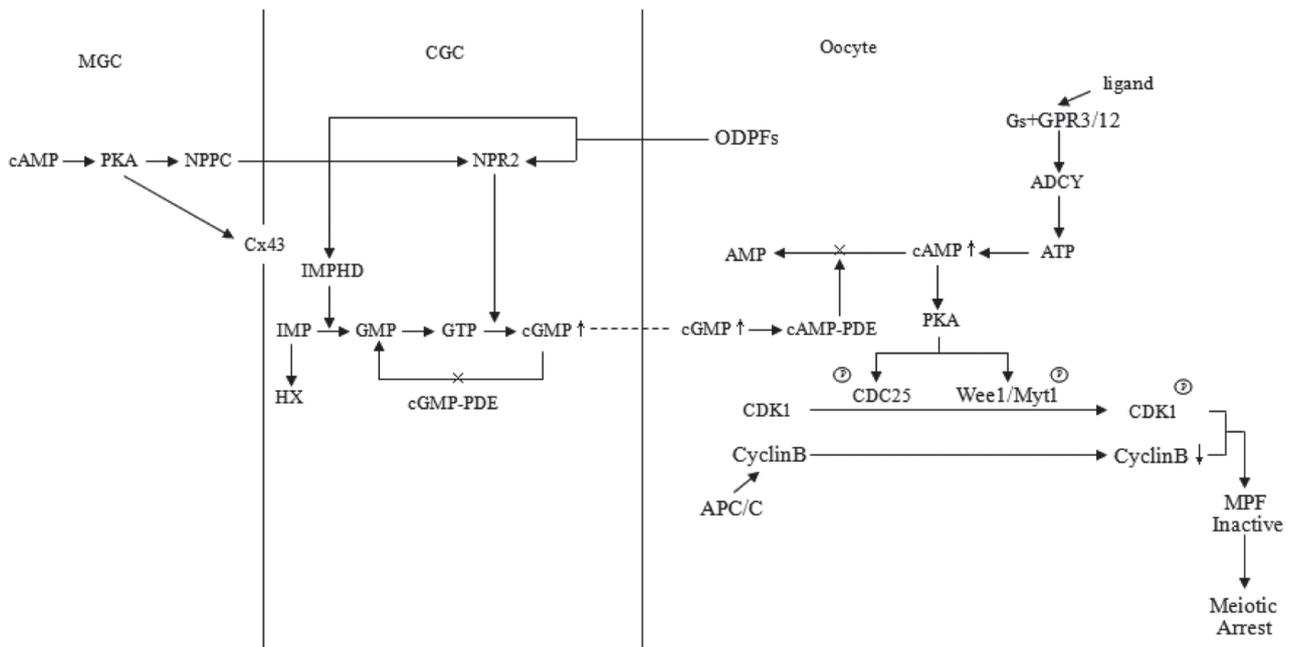
cAMP-磷酸二酯酶 (cAMP-phosphodiesterase, cAMP-PDE) 是与 GPR-Gs-ADCY 一起作用生成 cAMP 的一个重要酶。体内 cAMP-PDE 的活化将 cAMP 去磷酸化为 AMP 以降低卵母细胞内 cAMP 水平, 因此, cAMP-PDE 的灭活才可维持卵母细胞内高水平的 cAMP, 继而维持减数分裂的阻滞。哺乳动物体内存在 11 个截然不同的磷酸二酯酶同工酶 (PDE1~11), 至少是由已发现的 20 种类型的基因编码。虽然它们在不同的细胞和组织中差异性表达和调节, 但是却有类似的结构。相比于 PDE4D 和

PDE4B 定位于卵泡膜细胞、壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞, PDE3 仅位于卵母细胞中^[13-14]。PDE3 特异性的抑制剂西洛酰胺作用于体外培养的人、小鼠和牛的 COCs 或裸卵 (denuded oocytes, DOs) 升高了卵母细胞内 cAMP 的水平并阻碍了减数分裂的进程^[15-16]。这些结果与 PDE3 敲除小鼠卵母细胞在体内或体外阻断减数分裂进程的研究结果一致^[17]。GPR3 是小鼠卵母细胞维持减数分裂阻滞所需的特异性蛋白, 因此 GPR3 敲除小鼠表现为不育^[18]。然而, GPR3 和 PDE3 同时敲除的小鼠却表现出部分生育功能的恢复^[17]。PDE3 和 GPR3 敲除小鼠的研究表明, PDE 和 GPR-Gs-ADCY 相互协调通过升高卵母细胞内 cAMP 的浓度来维持减数分裂的阻滞。以上研究可知卵母细胞似乎通过以下两种途径来维持减数分裂的阻滞 (图 1): (1) 活化的 GPR3-Gs-ADCY 级联反应产生的 cAMP 使得卵母细胞中 cAMP 水平升高; (2) PED3 活性的抑制阻碍了卵母细胞中 cAMP 的水解。两条途径共同作用将卵母细胞阻滞在第一次减数分裂前期的双线期直至 LH 峰的出现才开始恢复减数分裂。

GPR3-Gs-ADCY 信号转导中 GPR3 及其配体的结合活化了 GPR3-Gs-ADCY 信号通路。GPR 是最大的细胞表面跨膜蛋白家族, 它可被多种配体激活, 包括离子、肽、激素和生长因子。例如, 溶血磷脂是一组新的 GPCR 细胞外配体, 主要包括溶血磷脂酸、溶血磷脂酰胆碱、鞘氨醇磷酸胆碱和鞘氨醇 1- 磷酸。研究发现, GPR3/12 的配体鞘氨醇磷酸胆碱和鞘氨醇 1- 磷酸作用于小鼠卵母细胞, 延迟了卵母细胞的自发成熟^[19-21]。这些结果与活化的 GPR3 或 GPR12 作用于小鼠和大鼠的卵母细胞引起了减数分裂阻滞的结果一致^[5,10]。然而, 小鼠卵母细胞和卵丘颗粒细胞中均可检测到 GPR3 和鞘氨醇 1- 磷酸。因此, GPR3-Gs-ADCY 级联反应是由卵丘颗粒细胞衍生配体引发的这一结论仍需进一步探讨。

1.1.2 MPF活性的降低维持减数分裂的阻滞

哺乳动物体内的 MPF 在 GVBD 和随后卵母细胞成熟中发挥重要作用。MPF 是由周期蛋白依赖性蛋白激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1) 和细胞周期蛋白 B (Cyclin B) 组成的异质二聚体, 其中 CDK1 为催化亚基, Cyclin B 为调节亚基。CDK1



(1)卵母细胞自身的GPR-Gs-ADCY 和cAMP-PDE相互作用生成cAMP, 高浓度的cAMP活化了PKA引起CDK1磷酸化; 此外, APC/C降解Cyclin B, 使Cyclin B的活性降低。两者共同作用将MPF处于非活化态, 最终诱导了减数分裂阻滞; (2)壁颗粒细胞中的NPPC与卵丘颗粒细胞中的NPR2相结合, 诱导了cGMP的生成。cGMP进入卵母细胞抑制cAMP-PDE水解酶活性, 升高卵母细胞内cAMP浓度, 诱导了减数分裂的阻滞; (3)卵母细胞旁分泌因子诱导了NPR2和IMPDH的生成, IMPDH使得IMP 转化为 GMP, 为NPPC/NPR2系统提供更多的底物。此外, IMPDH维持了卵泡液中HX的水平, 而HX是cAMP-PDE水解酶活性抑制剂, 最终升高了卵母细胞内cAMP水平, 诱导了减数分裂的阻滞。

图1 卵母细胞第一次减数分裂阻滞

磷酸化特定的丝氨酸和苏氨酸残基,但其本身不具有激酶活性,必须与 Cyclin B 结合发挥其功能^[22]。卵母细胞中的研究发现,cAMP 水平的升高激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA),并磷酸化和活化核激酶 Weel/Myt1。这种激活作用反过来使细胞分裂周期蛋白 25B (cell division cycle 25B, CDC25B) 失活,而 CDC25B 是 CDK1 的激活剂,失活的 CDC25B 最终通过抑制 CDK1 的丝氨酸和苏氨酸磷酸化将 MPF 维持在非活化状态。细胞分裂周期蛋白 25A (cell division cycle 25A, CDC25A) 在减数分裂恢复中发挥重要作用,Solc 等^[23]研究表明,CDC25A 可以抵抗 cAMP 介导的减数分裂阻滞。然而,它在卵母细胞成熟中的作用尚不清楚,因为 CDC25A 缺陷型小鼠的胚胎具有致死性^[24]。相比之下,CDC25B 缺陷型的雌性小鼠由于低活性的 MPF 导致永久性减数分裂阻滞而不孕^[25]。另外,CDC25B 定位于 GV 期卵母细胞的细胞质中,并在 GVBD 发生前不久转移至细胞核,而 CDC25A 在 GVBD 之前已经特异性地定位于细胞核^[23]。因此,CDC25A 在减数分裂恢复中的功能将是未来值得探讨的一个重要方向。

Cyclin B 通过后期促进复合物/细胞周期体 (anaphase promoting complex/cyclosome, APC/C) 不断被降解,Cyclin B 活性的降低诱导了 MPF 的非活化状态,最终将卵母细胞阻滞在第一次减数分裂的前期。APC/C 是一种多亚基 E3 泛素连接酶,可将泛素转移到特定的靶蛋白上,促进其靶蛋白水解。在卵母细胞减数分裂过程中,APC/C 通过泛素化标记底物,在 2 种激活剂 Cdc20 和 Cdh1 的辅助下,识别 Cyclin B 蛋白上特定的 D box,并将泛素连接到 Cyclin B 蛋白上,使 Cyclin B 被 26S 蛋白酶体水解,MPF 活性下降。小鼠卵母细胞中 APC/C 介导的 Cyclin B 降解需要 Cdh1 的参与,Cdh1 的失活将导致卵母细胞减数分裂的恢复^[26]。因此,除了磷酸化使 CDK1 失活外,Cyclin B 的降解也导致了 MPF 活性的降低,两者共同作用将卵母细胞阻滞在第一次减数分裂前期的双线期(图 1)。

1.2 体细胞内信号在第一次减数分裂阻滞中的作用

1.2.1 cGMP抑制PDE3A的水解活性

哺乳动物卵母细胞从窦卵泡分离出来或在体外培养时自发恢复了减数分裂,这表明窦卵泡中的卵泡体细胞,特别是壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞,在控制卵母细胞减数分裂中发挥重要作用。但是,这似乎与前文中所提到的卵母细胞中 cAMP 维持减数

分裂阻滞相矛盾。直到近几年,研究才发现卵母细胞中抑制 PDE3A 活性的 cGMP 是由卵泡颗粒细胞扩散至卵母细胞。与 cAMP 一样,cGMP 是存在于真核细胞和原核细胞中的水溶性第二信使。cGMP 是在鸟苷酸环化酶 (guanylate cyclase, GC) 的作用下由 GTP 转化而来,而细胞内 cGMP-磷酸二酯酶 (cGMP-phosphodiesterase, cGMP-PDE) 可将 cGMP 水解。因此,壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞中合成的 cGMP 进入卵母细胞抑制 PDE3A 的水解活性,从而维持卵母细胞内高浓度的 cAMP,最终将卵母细胞阻滞在第一次减数分裂前期的双线期^[27-28](图 1)。

1.2.2 NPP/NPR信号调节卵巢内cGMP合成

近年来哺乳动物卵泡中发现的利钠肽受体 (natriuretic peptide receptors, NPRs) 在卵母细胞减数分裂阻滞中发挥重要作用。它包括 NPRA (NPR1)、NPRB (NPR2) 和 NPRC (NPR3) 3 种。其中 NPRA 和 NPRB 是 GC 受体,而 NPRC 是非 GC 受体,被认为是一种清除受体。NPRs 的活化开始于与细胞质膜上同源配体利钠肽 (natriuretic peptides, NPPs) 的相互作用。利钠肽家族包括心房利钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP)、脑利钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 和 C 型利钠肽 (C-type natriuretic peptide, CNP) 3 种多肽激素。NPRs 和 NPPs 相互作用通过 NPP/NPR 信号在调节卵巢内 cGMP 合成中发挥重要作用。

壁颗粒细胞、卵丘颗粒细胞和卵母细胞中 NPPs 和 NPRs 的选择性表达在调节减数分裂阻滞中发挥重要作用。人、小鼠和猪中的研究发现,NPR2 是 NPRs 家族中最重要的跨膜受体,主要存在于卵丘颗粒细胞,而其同源配体 NPPC 仅在壁颗粒细胞中表达。Mogessie 等^[29]研究发现,NPPC 和 NPR2 突变小鼠出现了减数分裂过早的恢复,并在排卵前卵母细胞中出现了杂乱的染色体和细胞质碎片。此外,重组小鼠 NPPC 诱导了体外培养的 COCs 中卵丘颗粒细胞上 NPR2 的表达,并通过升高卵丘颗粒细胞中 cGMP 的水平阻碍了卵母细胞的自发成熟^[30]。这与体外培养的猪 COCs 中 NPPC 诱导卵丘颗粒细胞上 cGMP 的生成,并扩散至卵母细胞维持减数分裂阻滞的结果一致^[31]。这些结果表明,卵母细胞减数分裂的阻滞需要卵泡体细胞中 NPPC/NPR2 信号通路的介导。

尽管猪壁颗粒细胞、卵母细胞和卵泡液中也发现了 NPPA^[32],但是,目前为止在任何卵泡细胞中均未检测到其功能性受体 NPR1。因此,本综述认为,

与 NPPC 相比, NPPA 可能在生物体中发挥不同的作用。此外, 重组猪 NPPB 可以以剂量依赖的方式通过诱导小鼠卵丘颗粒细胞中 cGMP 的生成来维持小鼠卵母细胞减数分裂的阻滞, 而这种阻滞作用可以被 NPR2 抑制剂完全逆转^[33]。这有可能是因为利钠肽氨基酸序列的同源性使得哺乳动物的 NPPB 和 NPPC 具有高度保守性。例如, 编码 NPPC 前体蛋白的 mRNA 序列在人、小鼠、大鼠和猪中是相同的。但是, 目前尚不清楚卵巢是怎样选择性表达 NPPs 和 NPRs 家族成员及其 NPPC/NPR2 信号通路。

不同于小鼠和猪的 NPR2 仅在颗粒细胞上表达, 牛卵母细胞中也检测到了 NPR2 mRNA, 但是, NPR1 和 NPR3 仍仅在卵丘颗粒细胞表达^[34]。此外, 小鼠和猪的研究中发现 NPPC 仅抑制了 COCs 减数分裂, 而对 DOs 没有作用^[34], 这就表明, 小鼠和猪中 NPPC 作用于卵丘颗粒细胞而不是卵母细胞。相比之下, 牛中的研究表明, NPPs 家庭成员 (NPPA、NPPB 或 NPPC) 单独或组合作用并没有抑制减数分裂的恢复, 但在体外培养 3 h 后 NPPA 和 NPPC 还是升高了卵丘颗粒细胞和卵母细胞中 cGMP 的水平, 培养 6 h 后 NPPA 和 NPPC 却阻碍了卵母细胞内 cAMP 水平的升高, 最终诱导了减数分裂的恢复^[34]。小鼠、猪和牛中观察到的矛盾结果可能是由于单胎动物和多胎动物对 NPP/NPR 信号通路的利用方式不同^[34]。然而, 另一相反的 Franciosi 等^[35]研究表明, NPPC 可以延缓牛卵母细胞减数分裂的恢复并提高随后卵母细胞的发育能力。此外, Xi 等^[36]在牛卵母细胞中检测到了 NPR2 的表达, 并且可以被壁颗粒细胞来源的 NPPC 或雌激素激活。总之, 尽管牛的研究存在着一定争议, 但是, 哺乳动物似乎是通过 NPPC/NPR2-cGMP-PDE3A 信号通路来诱导 cGMP 的生成 (图 1)。然而, 不同动物卵泡细胞中 NPPs/NPRs 表达的不同仍是未来值得探讨的方向。

1.2.3 IMPDH 调节卵巢内 cGMP 和 HX 的合成

卵丘颗粒细胞中 IMPDH 的活化参与卵母细胞减数分裂的阻滞。IMPDH 是鸟苷酰基嘌呤合成的限速酶, 将肌苷-5'-磷酸 (inosine-5'-monophosphate, IMP) 催化为黄苷-5'-磷酸 (xanthosine-5'-monophosphate, XMP), XMP 在 GMP 合成酶的作用下转化为 GMP, 随后通过一系列的酶反应, GMP 转变为 GTP, 而 GTP 在 GC 催化下生成 cGMP。先前在性成熟小鼠体内的研究表明, IMPDH 特定的脱氢酶抑制剂, 咪唑立宾或霉酚酸, 导致了卵母细胞减数分裂促性

腺激素非依赖性恢复^[37]。类似地, 这两种抑制剂作用于性成熟前的小鼠也引起了卵母细胞减数分裂过早的恢复, 并降低了随后卵母细胞的发育能力^[38]。IMPDH 维持减数分裂阻滞可能是通过以下两种途径相互协调 (图 1): (1) IMPDH 通过催化 IMP 产生更多卵丘颗粒细胞中 NPPC/NPR2 系统的底物以维持卵母细胞减数分裂阻滞; (2) IMPDH 维持卵泡液中次黄嘌呤 (hypoxanthine, HX) 的水平, HX 是卵母细胞中磷酸二酯酶抑制剂, 可以升高细胞内 cAMP 的浓度并增强减数分裂的阻滞作用^[39]。

小鼠和猪卵泡中 HX 水平为毫摩尔。尽管 IMP 可以通过从头合成途径或是在 HX 的介导下合成, 然而, 在 COCs 中 IMP 的生成主要还是从头合成途径。卵泡液中 HX 的减少并不能诱导体内卵母细胞的成熟, 但是, 体外相同浓度的 HX 却可以通过抑制 cAMP-PDE 的活性来升高卵母细胞内 cAMP 的水平并维持减数分裂的阻滞, 而这种阻滞作用可以通过 IMPDH 抑制剂来逆转^[40]。这些结果表明, HX 引起的减数分裂阻滞是独立于 NPPC/NPR2 系统, 但却都受到 IMPDH 活性的调控。在未来, IMPDH 敲除动物模型的建立可能对进一步探讨减数分裂阻滞的机制有一定意义。

为了探讨卵母细胞中 NPPC/NPR2 系统和 IMPDH 的作用关系, 研究者将卵母细胞从小鼠和猪 COCs 中分离出, 发现卵丘颗粒细胞中 NPR2 mRNA 的表达明显降低, 同时, 将这些卵丘颗粒细胞与完全生长的 DOs 或卵母细胞衍生的旁分泌因子共同培养时, 卵丘颗粒细胞中 NPR2 mRNA 的表达水平与完整的 COCs 相比完全恢复了^[30-31]。此外, Zhang 等^[30]研究还发现, 移除卵母细胞的卵丘颗粒细胞中 IMPDH1 mRNA 和 IMPDH2 mRNA 的表达均降低, 但当与 GV 期 DOs 共培养时, 其 mRNA 水平又升高, 并与 COCs 中表达水平相同。这些结果表明, NPPC/NPR2 和 IMPDH 诱导的减数分裂阻滞仍由卵母细胞自身操控, 但是, 目前尚不清楚这些调控是否由卵母细胞直接作用。一些卵母细胞来源的旁分泌因子和信号通路可能参与了这个过程, 但其重要机制仍需进一步探讨。

2 卵母细胞第一次减数分裂恢复

2.1 LH 通过调节 NPPC/NPR2 信号通路和 cGMP 动力学变化来诱导减数分裂的恢复

哺乳动物月经 / 发情周期中, LH 峰的出现诱导了阻滞在第一次减数分裂前期的卵母细胞启动了

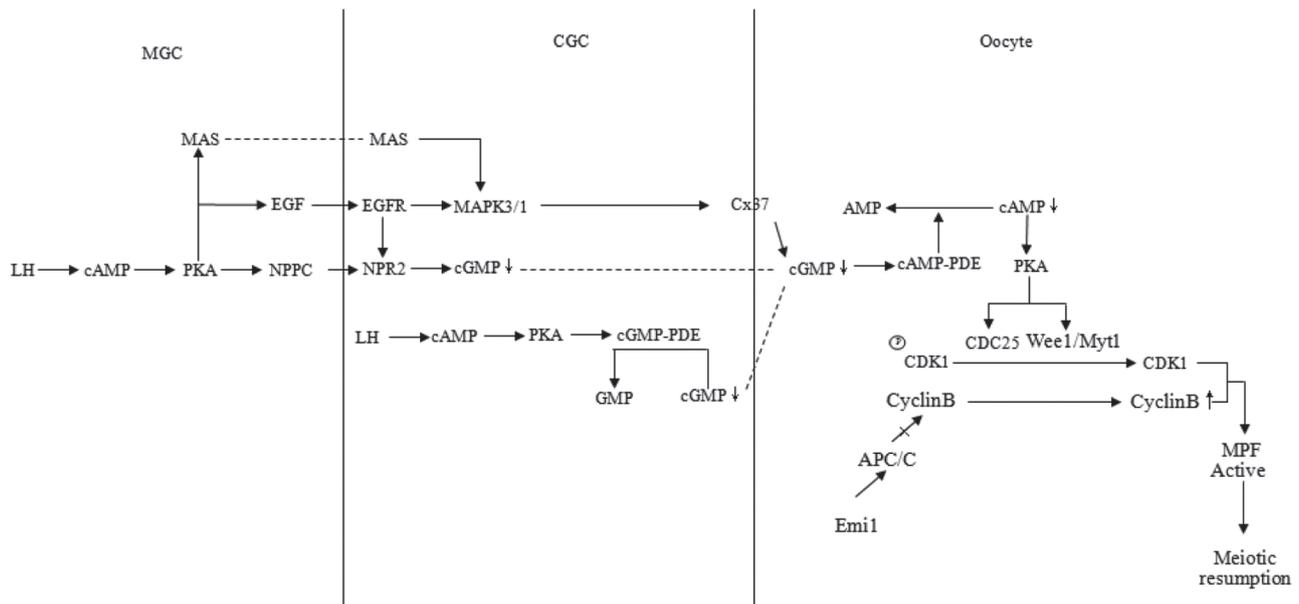
减数分裂恢复。LH 导致颗粒细胞中 cGMP 水平的降低, 继而降低卵母细胞内 cGMP 水平, 并诱导 cAMP-PDE 的活化, 降低 cAMP 的水平, 低水平的 cAMP 导致了 MPF 的活化, 从而使得卵母细胞恢复了减数分裂^[28,41](图 2)。LH 引起的卵泡内信号变化是精确的。利用荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术与环核苷酸传感器实时监测了 LH 峰所引起的卵母细胞内 cGMP 动力学水平的变化^[27]。

卵巢内 LH 信号需要穿过多层细胞才能进入卵母细胞发挥作用, 因为 LH 作用的位点主要位于卵泡膜细胞和壁颗粒细胞。卵泡膜细胞为卵泡的生长提供结构支持, 并在 LH 的诱导下生成雄激素, 雄激素被运送到邻近的壁颗粒细胞充当芳香化酶的底物。小鼠中的研究发现, LH 峰前后卵泡膜细胞中的 cGMP 始终保持在一个较低的恒定水平, 这就表明卵泡膜细胞可能不参与 LH 介导的小鼠卵母细胞减数分裂的恢复。这可能是由于卵泡膜细胞的颗粒细胞间缺乏 cGMP 流通的缝隙连接。因此, 排卵前 cGMP 的下调涉及颗粒细胞而不涉及卵泡膜细胞这一设想是合理的。

Robinson 等^[42] 在小鼠卵巢上的研究发现, hCG 注射 2 h 后, 卵巢的 NPPC 水平开始下降, 这与卵

母细胞细胞核核膜破裂的时间一致, 这就表明, NPPC 的降低诱导了 GVBD。类似地, 体外受精或卵泡浆单精子注射技术中女性在排卵剂量的 LH/ 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 作用后, 其卵泡液中 NPPC 的水平也出现了降低^[43]。与 LH 信号导致的 2 h 后 NPPC 水平的降低相比, 排卵前 LH/hCG 诱导后的前 20 min 内壁颗粒细胞上 NPR2 鸟苷酸环化酶活性迅速下降, 但并未观察到 NPR2 蛋白水平的降低^[42]。FRET 可视化实时监测小鼠细胞内 cGMP 流动的结果发现, 在 LH 作用 20 min 后, 壁颗粒细胞、卵丘颗粒细胞和卵母细胞中 cGMP 的水平一致性地降低^[27], 但是, 卵丘颗粒细胞中 NPR2 活性的下降仅出现在 2~3 h 后^[42]。这就表明, LH 诱导的壁颗粒细胞中 NPR2 活性的降低是启动减数分裂的先决条件, 卵丘颗粒细胞中 NPR2 活性的降低可能不参与 LH 介导的 cGMP 下调反应。本综述认为它可能对 cGMP 水平的降低起到了增强作用, 进一步促进减数分裂的恢复。

表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 可以引起体外培养的小鼠壁颗粒细胞中 NPPC mRNA 和 cGMP 水平的降低, 但 LH 却不可以^[43]。此外, 尽管卵丘颗粒细胞 NPR2 mRNA 的降低被认为不参



LH 峰一方面降低了颗粒细胞中 NPPC 和 NPR2 的水平; 另一方面诱导的 cAMP/PKA 信号通路磷酸化 cGMP-PDE5 并促进 EGF 和 EGF 样因子的生成, EGF 进一步诱导了 MAPK3/1 的活化。此外, 活化的 EGF 信号还可降低 NPR2 水平。两者的共同作用降低了卵母细胞内 cGMP 的水平, cGMP 水平的降低激活了 cAMP-PDE, 促进了 cAMP 的水解。低水平的 cAMP 使得 PKA 活性降低、CDK1 去磷酸化并与 Emi1 诱导的 Cyclin B 活化共同将 MPF 处于活化态, 最终诱导了减数分裂的恢复。

图2 卵母细胞第一次减数分裂的恢复

与减数分裂恢复, 但是, 小鼠 COCs 体外培养期间 EGF 的作用诱导了卵丘颗粒细胞中 NPR2 转录水平及其 GC 活性的降低, 并逆转了 NPPC 诱导的减数分裂阻滞^[44-45]。由于 LH 诱导卵泡内 EGF 样因子介导卵母细胞重新进入减数分裂细胞周期, 并参与体内其他重要的生理过程^[46], 本综述认为, LH/hCG 作用后卵泡液和颗粒细胞中 NPPC 的减少至少部分是通过 LH 介导的 EGF 样因子发挥作用的。一方面, 壁颗粒细胞中 EGF 或 EGF 样因子作为一种自分泌因子与其膜上的 EGFR 结合, 可能引起 NPPC 的减少; 另一方面, 这些壁颗粒细胞衍生的 EGF 样因子可能通过旁分泌的作用诱导卵丘颗粒细胞中 NPR2 表达的减少。因此, 壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞中 EGF 样因子共同作用降低了 cGMP 的水平并诱导减数分裂的恢复, 同时也增强了 LH 诱导的卵丘颗粒细胞中 NPR2 鸟嘌呤环化酶活化的降低^[45]。

卵泡内 cGMP 的流动是双向作用的: (1) LH 峰出现前, 颗粒细胞生成的 cGMP 通过缝隙连接从周围的颗粒细胞运送至卵母细胞, 并将减数分裂阻滞在第一次减数分裂前期的双线期; (2) 排卵前 LH 的作用诱导了 cGMP 浓度按照壁颗粒细胞、卵丘颗粒细胞和卵母细胞的顺序依次降低, 低水平的 cGMP 最终导致了卵母细胞减数分裂的重新启动^[47]。虽然以前的研究表明, 卵泡内 cGMP 水平的降低和减数分裂的恢复需要缝隙连接的关闭, 但是卵泡中 cGMP 水平下降到统一水平之前并没有发现缝隙连接间渗透性的降低。这就表明, LH 诱导的卵泡内 cGMP 快速向外扩散先于 LH 诱导的缝隙连接的渗透性降低。但是, LH 确实诱导了缝隙连接蛋白 Cx43 的磷酸化, 从而导致了在 GVBD 前某些体细胞间缝隙连接的关闭。本综述认为, cGMP 快速降低后缝隙连接的关闭作为增强作用进一步保证卵丘颗粒细胞和卵母细胞中 cGMP 水平的降低。

颗粒细胞中只有部分的 cGMP 减少是因为 LH 作用后快速的 NPR2 鸟苷酸环化酶去磷酸化和失活作用, 剩下的 LH 诱导 cGMP 减少的机制仍是无法解释的^[48]。啮齿动物研究表明, cGMP-PDE 的磷酸化和活化, 尤其是 cGMP-PDE5 参与 LH 诱导的减数分裂恢复^[49-50]。PDE5 丝氨酸位点的突变阻断 LH 诱导的 PDE5 磷酸化, 从而失去对卵母细胞减数分裂恢复的影响, 这就表明, 多数 PDE 家族成员必须通过 LH 信号的活化来介导 cGMP 的减少^[50]。PDE 家族在不同物种中选择性表达, 如大鼠卵泡中很少或几乎检测不到 PDE6A、PDE6B 和 PDE6C, 而

在猪 COCs 体外成熟期间检测到了大量 PDE6C^[51]; 此外, 猪的壁颗粒细胞细胞膜和细胞质中 PDE6C、PDE8A 和 PDE11A 免疫染色呈阳性^[52]。

2.2 LH通过调节MAPK3/1/MPF信号来诱导减数分裂恢复

MAPK3/1 和 MPF 在第一次减数分裂恢复中发挥重要作用(图2)。卵母细胞特异性同源盒 4 (oocyte-specific homeobox 4, Obox4) 是 MAPK3/1/MPF 上游的负调节因子。Obox4 的活化抑制了小鼠卵母细胞减数分裂双线期的恢复并将卵母细胞阻滞在 GV 期^[53]。Obox4 的敲除导致了小鼠卵母细胞中 MAPK3/1 和 MPF 的过早激活, 并诱导了减数分裂的恢复^[54]。卵丘颗粒细胞中 MAPK3/1 的激活是 LH 诱导减数分裂恢复的先决条件。LH 峰使壁颗粒细胞中 cAMP 浓度升高, 高浓度的 cAMP 诱导 EGF 信号激活, EGF 与卵丘颗粒细胞上的受体结合进一步激活卵丘颗粒细胞内 MAPK3/1 信号通路。活化的 MAPK3/1 磷酸化连接蛋白 37 (Connexin37, Cx37), 导致细胞间缝隙连接关闭, 细胞通讯中断, 阻碍了卵丘颗粒细胞向卵母细胞输送 cGMP。卵母细胞内 cGMP 水平的降低引起 PDE3A 的活化, 后者进一步降低了卵母细胞内 cAMP 的水平。低水平的 cAMP 诱导了减数分裂的恢复。此外, LH 介导的 cAMP 信号通路诱导了减数分裂激活物 (meiosis activating sterols, MAS) 的合成, 而 MAS 可激活 MAPK3/1, 进一步诱导了减数分裂的恢复^[55]。

另一方面, LH 峰诱导的 cAMP 水平的降低使 PKA 失活, 失活的 PKA 导致 Cdc25B 的活化和 Wee1/Myt1 的失活, 最终将 MPF 复合体上的 CDK1 去磷酸化激活。此外, 小鼠卵母细胞中, APC/C 活性受到早期有丝分裂抑制因子 1 (early mitotic inhibitor 1, Emi1) 的抑制。卵母细胞中注射吗啉代降低了 Emi1 活性从而阻碍了 Cyclin B 的积累, 最终延迟了 GVBD; 而 Emi1 过表达则升高了 Cyclin B 水平并引发了 GVBD^[55]。两者的共同作用诱导了阻滞在双线期的卵母细胞恢复了减数分裂。

3 总结与展望

哺乳动物卵母细胞中, 高水平的 cAMP 将卵母细胞阻滞在第一次减数分裂前期的双线期。卵母细胞 PDE3 活性的降低和自身独特的 PGR-Gs-NDCY 系统相互配合生成内源性 cAMP。虽然卵母细胞来源的 cAMP 对维持减数分裂阻滞至关重要, 但是周围颗粒细胞产生的 cGMP 通过抑制卵母细胞中

PDE3 活性来维持高水平的 cAMP 也发挥重要作用。壁颗粒细胞和卵丘颗粒细胞分别表达 NPPC 及其受体 NPR2, NPPC/NPR2 系统的选择性表达和活化诱导卵泡中颗粒细胞生成 cGMP。此外, IMPDH 将 IMP 转换为 GMP, 以为 NPR2 的活化准备更多的底物, 并进一步确保细胞内 cGMP 水平的升高。NPP/NPR 系统和 IMPDH 的活化由卵母细胞自身通过旁分泌因子来介导。卵母细胞内 cAMP 水平的升高激活 PKA, 引起 CDK1 磷酸化; 此外, APC/C 降解 Cyclin B, 使 Cyclin B 的活性降低。两者共同作用使 MPF 处于非活化态, 最终诱导了减数分裂阻滞。因此, LH 激增之前卵母细胞介导周围颗粒细胞生成的 cGMP 与自身 GPR-Gs-ADCY 系统级联反应合成的 cAMP 相互协同, 将减数分裂阻滞在第一次减数分裂前期的双线期。

当 LH 激增发生时, 首先 LH 诱导 NPR2 的 GC 去磷酸化和失活, 继而通过缝隙连接依次降低颗粒细胞和卵母细胞中 cGMP 浓度。cGMP 的向外扩散提前于 LH 诱导的缝隙连接的关闭可能是因为以下两个原因: (1) 缝隙连接渗透性的降低有助于维持卵母细胞中低浓度的 cGMP 水平; (2) 卵母细胞内 cGMP 的减少导致了卵母细胞来源的一些衍生因子减少, 包括颗粒细胞中的 NPR2 和 LHR, 以此最大限度地响应 LH 的刺激。此外, LH 诱导的颗粒细胞中 EGF 样生长因子可能通过旁分泌或自分泌通路进一步引发 EGFR 信号反应, 一方面降低了 NPPC 和 NPR2 的表达, 另一方面诱导了 MAPK3/1 的活化。总之, 这些信号相互配合将 LH 介导的反应传至整个卵泡, 来确保减数分裂进程的进行。

卵母细胞减数分裂是一个复杂的多因素调节过程, 是卵母细胞成熟过程的关键步骤。通过对卵母细胞减数分裂机制的深入了解和掌握, 才能更好地使得体外成熟的卵母细胞核质同步化, 提高卵母细胞的体外成熟率, 为体外受精、胚胎移植和转基因动物等动物胚胎工程技术的发展奠定基础。此外, 未成熟人卵母细胞体外成熟技术已成为辅助生殖技术中治疗不孕症的新途径, 是目前生殖医学领域的新热点。因此, 有必要对卵母细胞的发育成熟机制进行深入探讨, 以期提高胚胎质量, 使辅助生殖技术更好地为人类为社会服务。

[参 考 文 献]

- [1] Liu W, Xin Q, Wang X, et al. Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes in mammals. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e2662
- [2] Das D, Khan PP, Maitra S. Endocrine and paracrine regulation of meiotic cell cycle progression in teleost oocytes: cAMP at the centre of complex intra-oocyte signalling events. *Gen Comp Endocr*, 2017, 241: 33-40
- [3] Zhang H, Wei Q, Gao Z, et al. G protein-coupled receptor 30 mediates meiosis resumption and gap junction communications downregulation in goat cumulus-oocyte complexes by 17 β -estradiol. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019, 187: 58-67
- [4] Kalinowski RR, Berlot CH, Jones TL, et al. Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. *Dev Biol*, 2004, 267: 1-13
- [5] Firmani LD, Uliasz TF, Mehlmann LM. The switch from cAMP-independent to cAMP-dependent arrest of meiotic prophase is associated with coordinated GPR3 and CDK1 expression in mouse oocytes. *Dev Biol*, 2018, 434: 196-205
- [6] Mehlmann LM. Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Dev Biol*, 2005, 288: 397-404
- [7] Yang CR, Wei YC, Qi ST, et al. The G protein coupled receptor 3 is involved in cAMP and cGMP signaling and maintenance of meiotic arrest in porcine oocytes. *PLoS One*, 2012, 7: e38807
- [8] Zhong Y, Lin J, Liu X, et al. C-type natriuretic peptide maintains domestic cat oocytes in meiotic arrest. *Reprod Fert Dev*, 2016, 28: 1553-9
- [9] Hinckley M, Vaccari S, Horner K, et al. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Dev Biol*, 2005, 287: 249-61
- [10] Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, et al. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science*, 2004, 306: 1947-50
- [11] Horner K, Livera G, Hinckley M, et al. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Dev Biol*, 2003, 258: 385-96
- [12] Tresguerres M, Levin LR, Buck J. Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int*, 2011, 79: 1277-88
- [13] Richard FJ, Tsafirri A, Conti M. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biol Reprod*, 2001, 65: 1444-51
- [14] Vigone G, Shuhaibar LC, Egbert JR, et al. Multiple cAMP phosphodiesterases act together to prevent premature oocyte meiosis and ovulation. *Endocrinology*, 2018, 159: 2142-52
- [15] Viveiros MM, De La Fuente R. Regulation of mammalian oocyte maturation[M]//The Ovary: Academic Press, 2019: 165-80
- [16] Bezerra FTG, Silva AWB, Rissi VB, et al. Cilostamide and follicular hemisections inhibit oocyte meiosis resumption and regulate gene expression and cAMP levels in bovine cumulus-oocyte complexes. *Livest Sci*, 2016, 184: 112-8

- [17] Vaccari S, Horner K, Mehlmann LM, et al. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Dev Biol*, 2008, 316: 124-34
- [18] Masciarelli S, Horner K, Liu CY, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J Clin Invest*, 2004, 114: 196-205
- [19] Ye X. Lysophospholipid signaling in the function and pathology of the reproductive system. *Hum Reprod Update*, 2008, 14: 519-36
- [20] Hinokio K, Yamano S, Nakagawa K, et al. Lysophosphatidic acid stimulates nuclear and cytoplasmic maturation of golden hamster immature oocytes *in vitro* via cumulus cells. *Life Sci*, 2002, 70: 759-67
- [21] Komatsu J, Yamano S, Kuwahara A, et al. The signaling pathways linking to lysophosphatidic acid-promoted meiotic maturation in mice. *Life Sci*, 2006, 79: 506-11
- [22] Li J, Tang JX, Cheng JM, et al. Cyclin B2 can compensate for Cyclin B1 in oocyte meiosis I. *J Cell Biol*, 2018, 217: 3901-11
- [23] Solc P, Saskova A, Baran V, et al. CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Dev Biol*, 2008, 317: 260-9
- [24] Ray D, Terao Y, Nimbalkar D, et al. Hemizygous disruption of Cdc25A inhibits cellular transformation and mammary tumorigenesis in mice. *Cancer Res*, 2007, 67: 6605-11
- [25] Daldello EM, Luong XG, Yang CR, et al. Cyclin B2 is required for progression through meiosis in mouse oocytes. *Development*, 2019, 146: dev172734
- [26] Holt JE, Tran SMT, Stewart JL, et al. The APC/C activator FZR1 coordinates the timing of meiotic resumption during prophase I arrest in mammalian oocytes. *Development*, 2011, 138: 905-13
- [27] Egbert JR, Uliasz TF, Shuhaibar LC, et al. Luteinizing hormone causes phosphorylation and activation of the cGMP phosphodiesterase PDE5 in rat ovarian follicles, contributing, together with PDE1 activity, to the resumption of meiosis. *Biol Reprod*, 2016, 94: 1-11,110
- [28] Jaffe LA, Egbert JR. Regulation of mammalian oocyte meiosis by intercellular communication within the ovarian follicle. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 237-60
- [29] Mogessie B, Scheffler K, Schuh M. Assembly and positioning of the oocyte meiotic spindle. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2018, 34: 381-403
- [30] Zhang M, Su YQ, Sugiura K, et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*, 2010, 330: 366-9
- [31] Zhang Y, Wang H, Liu W, et al. Natriuretic peptides improve the developmental competence of *in vitro* cultured porcine oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017, 15: 41
- [32] Ogawa Y, Itoh H, Yoshitake Y, et al. Molecular cloning and chromosomal assignment of the mouse C-type natriuretic peptide (CNP) gene (Nppc): comparison with the human CNP gene (NPPC). *Genomics*, 1994, 24: 383-7
- [33] Zhang Y, Hao X, Xiang X, et al. Porcine natriuretic peptide type B (pNPPB) maintains mouse oocyte meiotic arrest via natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) in cumulus cells. *Mol Reprod Dev*, 2014, 81: 462-9
- [34] De Cesaro MP, Macedo MP, Santos JT, et al. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. *Anim Reprod Sci*, 2015, 159: 52-9
- [35] Franciosi F, Cotichio G, Lodde V, et al. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. *Biol Reprod*, 2014, 91: 61
- [36] Xi G, An L, Jia Z, et al. Natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) localized in bovine oocyte underlies a unique mechanism for C-type natriuretic peptide (CNP)-induced meiotic arrest. *Theriogenology*, 2018, 106: 198-209
- [37] Downs SM, Eppig JJ. Induction of mouse oocyte maturation *in vivo* by perturbants of purine metabolism. *Biol Reprod*, 1987, 36: 431-7
- [38] Downs SM. Induction of meiotic maturation *in vivo* in the mouse by IMP dehydrogenase inhibitors: effects on the developmental capacity of ova. *Mol Reprod Dev*, 1994, 38: 293-302
- [39] Wigglesworth K, Lee KB, O'Brien MJ, et al. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E3723-9
- [40] Downs SM, Daniel SA, Bornslaeger EA, et al. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gamete Res*, 1989, 23: 323-34
- [41] Zhang J, Wei Q, Cai J, et al. Effect of C-type natriuretic peptide on maturation and developmental competence of goat oocytes matured *in vitro*. *PLoS One*, 2015, 10: e0132318
- [42] Robinson JW, Zhang M, Shuhaibar LC, et al. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Dev Biol*, 2012, 366: 308-16
- [43] Pan B, Li J. The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reprod Biol Endocrinol*, 2019, 17: 8
- [44] Lee KB, Zhang M, Sugiura K, et al. Hormonal coordination of natriuretic peptide type C and natriuretic peptide receptor 3 expression in mouse granulosa cells. *Biol Reprod*, 2013, 88: 42
- [45] Zhang M. A new understanding on the regulation of oocyte meiotic prophase arrest and resumption[M]// Chian RC, Hargund G, Huang JYJ. *Development of in vitro maturation for human oocytes*. Springer: Cham, 2017: 59-74
- [46] Yang XY, Jia ZW. The role of EGF-like factor signaling pathway in granulosa cells in regulation of oocyte maturation and development. *Hereditas*, 2019, 41: 137-45
- [47] Egbert JR, Shuhaibar LC, Edmund AB, et al. Dephosphorylation and inactivation of NPR2 guanylyl cyclase in granulosa cells contributes to the LH-induced decrease in cGMP that causes resumption of meiosis in rat oocytes. *Development*, 2014, 141: 3594-604

- [48] Shuhaibar LC, Egbert JR, Edmund AB, et al. Dephosphorylation of juxtamembrane serines and threonines of the NPR2 guanylyl cyclase is required for rapid resumption of oocyte meiosis in response to luteinizing hormone. *Dev Biol*, 2016, 409: 194-201
- [49] Egbert JR, Uliasz TF, Shuhaibar LC, et al. Luteinizing hormone causes phosphorylation and activation of the cGMP phosphodiesterase PDE5 in rat ovarian follicles, contributing, together with PDE1 activity, to the resumption of meiosis. *Biol Reprod*, 2016, 94: 110
- [50] Egbert JR, Yee SP, Jaffe LA. Luteinizing hormone signaling phosphorylates and activates the cyclic GMP phosphodiesterase PDE5 in mouse ovarian follicles, contributing an additional component to the hormonally induced decrease in cyclic GMP that reinitiates meiosis. *Dev Biol*, 2018, 435: 6-14
- [51] Sasseville M, Cote N, Gagnon MC, et al. Up-regulation of 3'5'-cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase in the porcine cumulus-oocyte complex affects steroidogenesis during *in vitro* maturation. *Endocrinology*, 2008, 149: 5568-76
- [52] Bergeron A, Guillemette C, Sirard MA, et al. Active 3'-5' cyclic nucleotide phosphodiesterases are present in detergent-resistant membranes of mural granulosa cells. *Reprod Fertil Dev*, 2017, 29: 778-90
- [53] Hao X, Wang Y, Kong N, et al. Epidermal growth factor-mobilized intracellular calcium of cumulus cells decreases natriuretic peptide receptor 2 affinity for natriuretic peptide type C and induces oocyte meiotic resumption in the mouse. *Biol Reprod*, 2016, 95: 45
- [54] Lee HS, Kim KH, Kim EY, et al. Obox4-silencing-activated STAT3 and MPF/MAPK signaling accelerate nuclear membrane breakdown in mouse oocytes. *Reproduction*, 2016, 151: 369-78
- [55] Sun QY, Mio YL, Schatten H. Towards new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle*, 2009, 8: 2741-7