

## 综述

# 卵母细胞减数分裂阻滞与促黄体素诱导减数分裂恢复的分子机制研究进展

郝肖琼<sup>1,2,\*</sup>, 徐劲恺<sup>3</sup>, 石瑞丽<sup>1</sup>

<sup>1</sup>包头医学院生理学教研室; 包头 014040; <sup>2</sup>中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; <sup>3</sup>包头医学院第一附属医院, 包头 014040

**摘要:** 哺乳动物排卵前, 卵泡中的卵母细胞一直被阻滞在减数分裂I前期的双线期, 卵泡壁层颗粒细胞分泌的C型利尿钠肽(C-type natriuretic peptide, NPPC)与表达在卵丘细胞中的同源利尿钠肽受体2(natriuretic peptide receptor 2, NPR2)结合, 产生的cGMP是维持减数分裂阻滞的关键因子。另外, cAMP、缝隙连接、肌苷单磷酸脱氢酶(inosine monophosphate dehydrogenase, IMPDH)等多种重要调控因子也参与了减数分裂阻滞。当垂体分泌的促黄体素(luteinizing hormone, LH)峰到来时, LH通过多种调控方式迅速降低胞内cGMP水平, 使卵母细胞恢复减数分裂。本文对维持卵母细胞减数分裂I阻滞以及LH诱导减数分裂恢复的机制研究进展进行综述, 为相关生殖疾病的预防和诊治提供思路。

**关键词:** 卵母细胞减数分裂; 环鸟苷酸; C型利尿钠肽; 利尿钠肽受体2; 促黄体素

**中图分类号:** Q492.5; R339.2

## Advances in molecular mechanisms of meiotic arrest and luteinizing hormone-induced meiotic resumption in oocytes

HAO Xiao-Qiong<sup>1,2,\*</sup>, XU Shao-Kai<sup>3</sup>, SHI Rui-Li<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Baotou Medical College, Baotou 014040, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory for Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China; <sup>3</sup>First Affiliated Hospital, Baotou Medical College, Baotou 014040, China

**Abstract:** Mammalian oocytes within Graafian follicles are arrested at prophase I of meiosis. C-type natriuretic peptide (NPPC), secreted by mural granulosa cells (MGCs), maintains oocyte meiotic arrest via binding to its cognate receptor natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and producing cyclic guanosine monophosphate (cGMP). NPR2 is most concentrated in the cumulus cells. In addition, cAMP, gap junction, inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) and other important regulatory factors are also involved in meiotic arrest. Luteinizing hormone (LH) then rapidly decreases cGMP and induces oocyte meiotic resumption. In this paper, advances in the molecular mechanisms of meiotic arrest and LH-induced meiotic resumption were reviewed. This paper may provide new ideas for the prevention, diagnosis and treatment of related reproductive diseases.

**Key words:** meiosis; cyclic guanosine monophosphate; C-type natriuretic peptide; natriuretic peptide receptor 2; luteinizing hormone

Received 2019-09-23 Accepted 2020-03-20

Research from the corresponding author's laboratory was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81960734), the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region, China (No. 2018BS03022), the Scientific Research Projects of Institutions of Higher Learning in Inner Mongolia Autonomous Region, China (No. NJZY18188) and Youth Science and Technology Talent Support Program of Inner Mongolia Autonomous Region, China (No. NJYT-19-B23).

\*Corresponding author. Tel: +86-472-7167848; E-mail: haoxiaoqiong@126.com

卵母细胞第一次减数分裂(减数分裂 I)阻滞与恢复的精密调控对哺乳动物的正常繁殖至关重要,减数分裂起始于胚胎发生时期,随后一直被阻滞在减数分裂 I 前期的双线期,减数分裂的阻滞是由卵母细胞以及体细胞(壁层颗粒细胞/卵丘颗粒细胞)中多种调控因子构成的信息网络共同维持的。卵母细胞内高水平 cAMP 是维持减数分裂阻滞的关键因子<sup>[1, 2]</sup>,而卵泡壁层颗粒细胞分泌的 C 型利尿钠肽(C-type natriuretic peptide, NPPC)与表达在卵丘细胞中的利尿钠肽受体 2(natriuretic peptide receptor 2, NPR2)结合产生的 cGMP 能够通过缝隙连接由卵丘细胞进入卵母细胞, cGMP 可抑制特异性水解 cAMP 的磷酸二酯酶 3A(phosphodiesterase 3A, PDE3A)的活性<sup>[3]</sup>,因而维持减数分裂阻滞。当青春期来临时,下丘脑分泌的促黄体素(luteinizing hormone, LH)诱导卵母细胞恢复减数分裂, LH 诱导减数分裂的恢复是一个复杂的过程,涉及多种调控因子及一系列信号转导通路的协同配合,例如 PKA、PKC、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路等<sup>[4–7]</sup>,这些信号转导通路及相关调控机制已有文献详细描述<sup>[8, 9]</sup>,本文不再赘述。cGMP 是维持减数分裂阻滞的关键因子,因此,在 LH 诱导减数分裂恢复的过程中,研究 LH 对 cGMP 的调控机制具有重要意义。本文主要综述关于哺乳动物排卵前卵泡中卵母细胞减数分裂阻滞的关键调控因子,以及 LH 如何通过逆转这些阻滞因子诱导减数分裂恢复的研究进展,以期为临床相关疾病如多囊卵巢综合征等的诊治提供理论依据。

## 1 卵泡结构

卵巢内有多种不同大小的卵泡,最小的是原始卵泡,最大的是排卵前卵泡,此时卵泡内的卵母细胞与包围着卵母细胞的 2~3 层颗粒细胞(也叫做卵丘细胞)合称为卵丘卵母细胞复合物(cumulus-oocyte complex, COCs),而紧贴着卵泡腔的 5~10 层颗粒细胞叫做壁层颗粒细胞。壁层颗粒细胞的外层形成假复层上皮,向胞外基质延伸形成基膜,膜细胞为生长卵泡提供结构支持,膜细胞的发育往往伴随着许多小血管的生成,此过程有利于促性腺激素、营养物质以及代谢产物的运输<sup>[10]</sup>。

卵母细胞在卵泡内随着卵泡的发育而发育,不同物种排卵前卵泡中卵母细胞的直径变化范围较小,一般为 70~120  $\mu\text{m}$  之间<sup>[11]</sup>,然而,卵母细胞直

至发育到格拉夫卵泡期,仍被阻滞在减数分裂 I 前期的双线期。前期阻滞的卵母细胞内含有一个特征性的核,体积很大,具有部分浓缩的染色质,叫做生发泡(germinal vesicle, GV)<sup>[12]</sup>, LH 峰的到来使卵母细胞恢复减数分裂,减数分裂恢复的首要特征就是生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD),核仁消失,减数分裂恢复后,卵母细胞从卵泡排出进入输卵管,等待受精。

## 2 卵母细胞减数分裂阻滞的关键调控因子

### 2.1 缝隙连接

当卵泡发育至排卵前卵泡时,卵泡内的卵母细胞依然维持阻滞状态。如果将 COCs 从卵泡中释放出来,卵母细胞会自发恢复减数分裂,这种现象存在于所有的哺乳动物中,包括人类,这说明存在细胞外的抑制减数分裂恢复的信号,而抑制减数分裂恢复的信号是通过缝隙连接或通过卵泡液由颗粒细胞进入卵母细胞中的。缝隙连接使所有的颗粒细胞形成一个功能性的合胞体,卵丘细胞与卵母细胞之间也存在缝隙连接,主要为缝隙连接蛋白 37(connexin 37, Cx37),卵泡的其它部位主要为缝隙连接蛋白 43(connexin 43, Cx43)<sup>[13, 14]</sup>。缝隙连接的抑制剂 carbenoxolone 可诱导排卵前卵泡中的卵母细胞恢复减数分裂<sup>[13, 15]</sup>,抑制缝隙连接也能导致减数分裂恢复<sup>[15, 16]</sup>,这说明从壁层颗粒细胞向卵母细胞传递的抑制信号需要壁层颗粒细胞间、壁层颗粒细胞与卵丘细胞间以及卵丘细胞与卵母细胞间的缝隙连接。

### 2.2 cAMP

卵母细胞减数分裂的阻滞由胞内高水平的 cAMP 维持<sup>[1, 2]</sup>。有研究者认为颗粒细胞产生的 cAMP 可通过缝隙连接进入卵母细胞,从而抑制减数分裂的恢复<sup>[17]</sup>;但进一步的研究显示,卵母细胞自身就可以产生足量的 cAMP。卵母细胞通过 Gs 蛋白刺激腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, ADCY),产生 cAMP<sup>[8, 9, 18]</sup>,Gs 的激活需要跨膜 G 蛋白耦联受体(G protein-coupled receptors, GPRs)。近期的研究显示, GPR3 通过升高 cAMP 水平增强小鼠卵母细胞减数分裂的能力<sup>[19]</sup>,此外, GPR3 也能够维持猪卵母细胞减数分裂的阻滞<sup>[20]</sup>。在大鼠中,激活 Gs 相应的受体是 GPR12<sup>[18]</sup>,人类卵母细胞中存在 GPR3<sup>[21]</sup>,但其作用未得到证实。到目前为止,尚未发现有内源性的激动剂能够激活 GPR3 或 GPR12,提示这些

受体可能自身具有活性。因此，卵母细胞自身通过 GPRs/Gs/ADCY 产生足量 cAMP 维持减数分裂的阻滞。

卵母细胞内的细胞周期蛋白依赖激酶 1 (Cyclin dependent kinase 1, CDK1) 与细胞周期蛋白 B (Cyclin B) 结合形成异二聚体，称为 M 期促进因子 (M phase-promoting factor, MPF)，调控着减数分裂的进程。卵母细胞内高水平的 cAMP 通过调控 PKA 进而调控 CDK1 的活性，以此维持减数分裂的阻滞，其具体机制是：cAMP 激活 PKA 后，导致核激酶 Wee1/Myt1 的磷酸化激活，这一过程反过来抑制了细胞分裂周期蛋白 25B (cell division cycle 25B, CDC25B) 的活性，而 CDC25B 可使 CDK1 的 Thr14 与 Tyr15 去磷酸化从而激活 CDK1，因此最终通过抑制 CDK1 的活性使 MPF 处于失活状态，以此维持减数分裂阻滞<sup>[22]</sup>。除了 CDC25B，CDC25A 同样在减数分裂恢复中发挥作用<sup>[23]</sup>，由于 CDC25A 敲除小鼠会在胚胎期死亡，因此 CDC25A 发挥作用的具体机制目前还不清楚。MPF 的另一组分 Cyclin B1 是参与减数分裂阻滞的主要因子<sup>[24]</sup>，而近期的研究显示，Cyclin B2 对减数分裂的阻滞也至关重要，*Ccnb2*<sup>-/-</sup>小鼠卵母细胞发生 GVBD 的时间延长，减数分裂由中期转向后期的过程出现异常，体内实验表明，Cyclin B2 缺失会导致未成熟卵母细胞排卵，卵巢早衰，严重损害雌性小鼠生育能力<sup>[25]</sup>。目前对 Cyclin B3 在卵母细胞成熟中的作用知之甚少，仅有一篇研究报道了 Cyclin B3 控制着减数分裂中期向后期的转变<sup>[26]</sup>。

### 2.3 cGMP

早有研究显示，将卵母细胞从卵泡中释放出来后，胞内 cAMP 水平会降低<sup>[27]</sup>，这说明卵泡颗粒细胞也参与了对卵母细胞内 cAMP 水平的调节。有学者认为，颗粒细胞能够合成和分泌一种维持卵母细胞内 GPR3 活性的物质，但把卵母细胞从卵泡中释放出来后，Gs 的活性并没有发生变化<sup>[28]</sup>；此外，还有一种猜测是额外的 cAMP 从颗粒细胞进入卵母细胞中，增加胞内 cAMP 的含量，但是当卵母细胞缺失 GPR3/Gs 调控后，颗粒细胞产生 cAMP 的量并不足以维持减数分裂的阻滞；因此，颗粒细胞可能分泌了一种抑制 PDE3A 活性的物质，使 cAMP 无法被水解，由此维持卵母细胞内高水平的 cAMP。

研究表明，cGMP 能够抑制 PDE3A 的活性<sup>[29]</sup>。在体外培养的 COCs 中，cGMP 的激动剂可抑制减

数分裂恢复，但对裸卵并没有作用；抑制颗粒细胞与卵母细胞之间的缝隙连接会降低卵母细胞内 cGMP 的含量，导致减数分裂恢复<sup>[30]</sup>；这些证据证明，颗粒细胞产生的 cGMP 通过缝隙连接进入卵母细胞，抑制了 cAMP 的水解，维持减数分裂的阻滞。注射 cGMP 特异性磷酸二酯酶 PDE9 能够降低 cGMP 水平，导致卵母细胞恢复减数分裂，而添加 PDE3A 的抑制剂 milrinone 能够抑制减数分裂的恢复，这进一步说明 cGMP 通过抑制 cAMP 的水解维持减数分裂的阻滞，卵泡内的卵母细胞中 cGMP 浓度约为 900 nmol/L，该浓度足以抑制 PDE3A 的活性<sup>[29,31]</sup>。

### 2.4 NPPC/NPR2 系统

颗粒细胞产生的 cGMP 是维持减数分裂阻滞的关键因子，cGMP 的产生依赖于颗粒细胞中表达的 NPPC 与表达在卵丘细胞中的同源受体 NPR2 的相互作用<sup>[3,32]</sup>。体外添加 10~100 nmol/L NPPC 能够抑制小鼠<sup>[33]</sup>、猪<sup>[34]</sup>、牛<sup>[35]</sup>以及猫<sup>[36]</sup>卵母细胞减数分裂的恢复，但对裸卵不起作用，这是因为裸卵并不表达 NPR2。在 *Nppc*<sup>l<sup>bab</sup></sup>/*Nppc*<sup>l<sup>bab</sup></sup> 以及 *Npr2*<sup>cn-2j</sup>/*Npr2*<sup>cn-2j</sup> 基因突变的小鼠中，卵母细胞减数分裂的恢复会提前<sup>[3]</sup>；在 *Npr2* 缺失的卵泡中，cGMP 水平降低，雌性 *Npr2* 突变小鼠不育<sup>[37]</sup>；NPR2 基因功能缺失突变的人类女性在杂合子情况下是可以生育的，但是在纯合子情况下生育能力有什么变化，目前尚未有研究报道<sup>[38]</sup>。

Zhang 等于 2010 年的研究揭示了 NPPC 维持小鼠卵母细胞减数分裂阻滞的机制：壁层颗粒细胞产生的 NPPC 通过激活其表达在卵丘细胞中的特异受体 NPR2 产生 cGMP，cGMP 通过缝隙连接由卵丘细胞进入卵母细胞，抑制了卵母细胞内 PDE3A 的活性，使 cAMP 无法水解，由此维持胞内高水平的 cAMP，使减数分裂持续阻滞<sup>[3]</sup>，因此，cGMP 是维持减数分裂阻滞的关键因子（图 1）。近期利用猪 COCs 的研究也证明了这一点<sup>[39]</sup>。

另外，Wang 等利用脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 制备小鼠多囊卵巢综合征模型，发现无排卵卵巢中 NPPC/NPR2 活性显著增加，并伴随高雌激素水平<sup>[40]</sup>。这一研究进一步证明了 NPPC/NPR2 系统在雌性动物生殖过程中的重要作用，近年来多囊卵巢综合征的发病率愈加增长，严重威胁育龄期妇女的正常生育，因此，对 NPPC/NPR2 系统更深入的研究将具有十分重要的意义。

## 2.5 肌苷单磷酸脱氢酶(inosine monophosphate dehydrogenase, IMPDH)

卵丘细胞中 IMPDH 的激活对于减数分裂阻滞的维持是必要的(图 1)。在体外培养的 COCs 中, IMPDH 抑制剂能够逆转由 NPPC 抑制的减数分裂的恢复<sup>[41]</sup>, 这是因为 IMPDH 催化肌苷-5'-磷酸(inosine-5'-monophosphate, IMP)转变为黄苷-5'-磷酸(xanthosine-5'-monophosphate, XMP), GMP 合成酶催化 XMP 为 GMP, 之后通过系列酶反应, GMP 转变为 GTP, GTP 作为鸟苷酸环化酶的底物, 有利于 NPR2 产生 cGMP(图 1)。另外, IMPDH 可维持卵泡液中次黄嘌呤(hypoxanthine, HX)的浓度, HX 抑制卵母细胞内 PDE 的活性, 可增加胞内 cAMP 水平, 使减数分裂阻滞<sup>[41]</sup>。HX 与 NPPC/NPR2 系统维持减数分裂阻滞是相互独立的, 但都受 IMPDH 的调控。

## 2.6 近期发现的其它重要调控因子

雌性减数分裂阻滞蛋白(meiosis arrest female 1, MARF1)是控制卵母细胞减数分裂进程和逆转录转座子调控的核糖核酸酶, 其核糖核酸酶活性调控着减数分裂和基因组的完整性<sup>[42]</sup>, *Marf1* 基因突变将导致雌性小鼠不育, 但雄性小鼠可育<sup>[43, 44]</sup>, 其原因是雌鼠卵母细胞不能恢复减数分裂而排出了未成熟的卵。卵子受精及物种繁殖需要减数分裂正常恢复以及基因组具有完整性, 因此 MARF1 的作用对于临床诊治女性不孕具有重要意义, 但其具体机制仍需更深入的研究。

CRL4 (Cullin ring-finger ubiquitin ligase 4) 在维持卵母细胞存活和减数分裂进程中具有多种功能, 近期的研究显示, 一个新的 CRL4 E3 泛素连接酶底物识别蛋白 DCAF13 可通过诱导 PI3K 通路的关键调节蛋白 PTEN 发生多聚泛素化降解, 从而维持卵母细胞中 PI3K 信号通路的活性, 促进卵泡发育和卵母细胞减数分裂成熟<sup>[45]</sup>; 敲除 *Dcaf13* 则会影响 pre-rRNA 的剪切和核糖体小亚基的组装, 导致卵母细胞生长缓慢, 很快凋亡, 造成卵巢早衰<sup>[46]</sup>。Yu 等研究表明, CRL4-DCAF1 E3 泛素连接酶能够通过调节蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 降解, 进而调控卵母细胞减数分裂恢复进程<sup>[47]</sup>。

*Zar1* (Zygote arrest-1) 是最早发现的母源效应基因, *Zar1* 还有一个表达模式相似的同源基因 *Zar2*。*Zar1* 基因敲除的小鼠表现为雌性不育<sup>[48]</sup>, 形成的胚胎不能发生卵裂, 大多阻滞在受精卵时期, 而近期的研究显示, *Zar1/2* 敲除小鼠卵母细胞减数分裂恢复以及第一极体的排出均发生延迟, 卵胞质中储存的母源 mRNA 明显减少, 蛋白合成水平降低, 且 *Zar1/2* 敲除小鼠卵母细胞没有发生与成熟相关的关键变化<sup>[49]</sup>, 因此, ZAR1/2 并非以往学者们所认为的母源效应因子, 它们早在卵母细胞成熟过程中就发挥了重要功能, 母源性 *Zar1* 缺失的胚胎所表现的发育阻滞表型是前期减数分裂异常的后续影响。

除上述发现的调控因子外, 近年来发现在卵母细胞减数分裂周期中具有调节作用的因子还有很

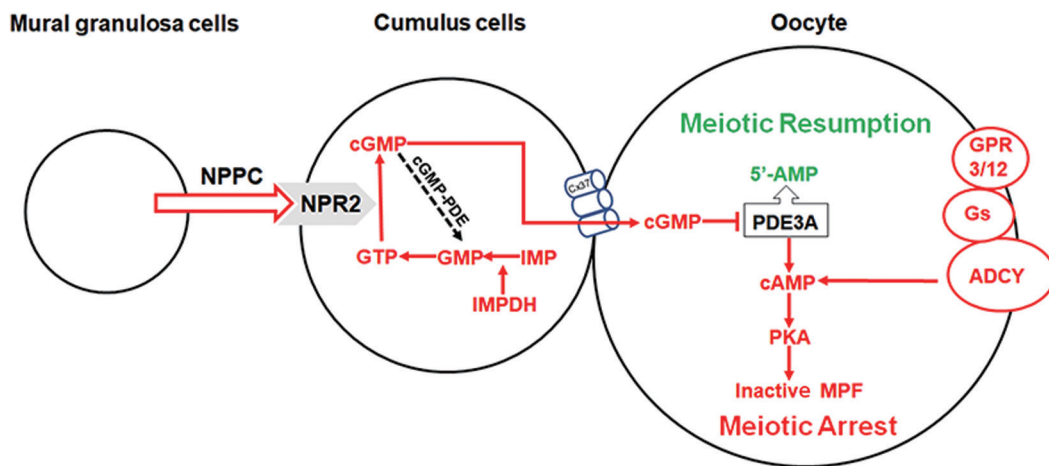


图 1. 卵母细胞减数分裂阻滞的调控

Fig. 1. Regulation of oocyte meiotic arrest. NPPC, C-type natriuretic peptide; NPR2, natriuretic peptide receptor 2; IMP, inosine-5'-monophosphate; IMPDH, inosine monophosphate dehydrogenase; PDE, phosphodiesterase; MPF, M phase-promoting factor; ADCY, adenylyl cyclase; GPR3/12, G protein-coupled receptors 3 and 12; Gs, GNAS (guanine nucleotide binding protein,  $\alpha$  stimulating) complex. The picture was modified from reference<sup>[3]</sup> with permission.

多,例如,组蛋白甲基化的表观遗传修饰在生殖细胞发育过程中具有非常重要的作用,其中组蛋白H3第4位赖氨酸的三甲基化修饰(H3K4me3)由于在基因组中分布广泛、功能重要,而H3K4me3调控因子CFP1(CxxC finger protein-1)对维持减数分裂正常周期的进程至关重要,Cxxc1敲除的卵母细胞表现为纺锤体组装缺陷、染色体排列混乱、不能排出第一极体等等,致使减数分裂I无法恢复<sup>[50]</sup>。此外还有编码核酸去腺苷酸化酶复合体CCR4-NOT催化亚基的Cont61,该基因编码的蛋白通过调控母源基因降解在减数分裂进程中发挥重要作用,Cont61敲除的雌鼠生育能力严重受损<sup>[51]</sup>。

### 3 LH通过调控阻滞关键因子诱导卵母细胞减数分裂恢复

#### 3.1 LH诱导颗粒细胞中cGMP水平降低

在大鼠及小鼠中,LH降低卵母细胞内cGMP水平的同时往往伴随着卵泡内cGMP水平的降低<sup>[29,30,52]</sup>,小鼠卵泡内的cGMP水平在LH处理1 h后可由1 μmol/L降至100 nmol/L<sup>[30,53,54]</sup>。低水平的cGMP可维持至少5 h<sup>[52,53,55]</sup>。此外,LH还能够引起人黄素化颗粒细胞中cGMP水平降低<sup>[55]</sup>。

Shuhaibar等研究显示,在LH处理前,颗粒细胞、卵丘细胞和卵母细胞内的cGMP水平是一致的,LH处理1 min后,颗粒细胞中cGMP含量开始下降,

10 min降到最低,在卵丘细胞中,cGMP开始下降的时间为5 min,卵母细胞为7 min,LH处理20 min后,整个卵泡内cGMP水平都非常低<sup>[54]</sup>,这说明LH诱导的cGMP水平降低,最先从颗粒细胞开始,然后为卵丘细胞,最后是卵母细胞。

Shuhaibar等利用carbenoxolone抑制卵泡内的缝隙连接,发现表达NPR2的颗粒细胞和卵丘细胞中cGMP水平均较高,然而不表达NPR2的卵母细胞中cGMP水平降低<sup>[54]</sup>;添加carbenoxolone后,LH处理20 min可降低颗粒细胞中cGMP水平,因为颗粒细胞表达LH受体(LH receptor, LHR),而卵丘细胞内cGMP水平的降低则要延迟到LH处理2 h之后,这说明LH诱导卵丘细胞内cGMP水平的降低是由于cGMP通过缝隙连接向外扩散到了颗粒细胞中,之后,卵丘细胞中的cGMP才降低并维持低水平。

#### 3.2 LH下调NPPC/NPR2活性从而减少cGMP合成

##### 3.2.1 LH对NPPC的下调作用

在大鼠、小鼠、猪以及人类中,NPPC水平的下降对于LH导致的cGMP水平持续降低具有很重要的意义<sup>[33,34,52,55,56]</sup>,如在小鼠卵巢中,激活LHR 2 h后NPPC的含量下降到初始值的一半,但NPPC含量下降的速度比较慢,难以使卵泡内cGMP水平快速降低,然而NPPC含量的下降对后续cGMP低水平的维持具有重要作用<sup>[54]</sup>(图2)。

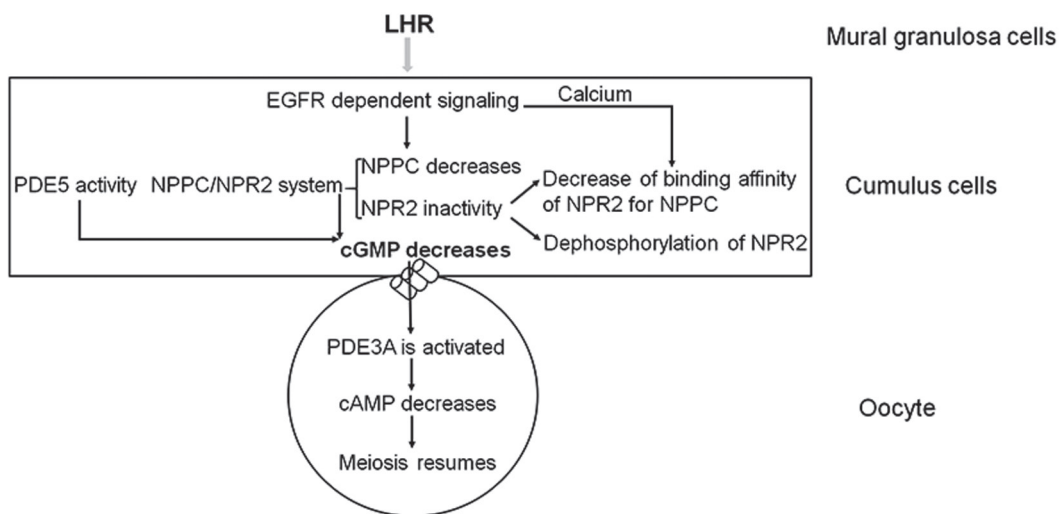


图 2. LH诱导卵母细胞减数分裂恢复的信号转导通路

Fig. 2. Signaling pathways for LH receptor (LHR) to resume meiosis in oocytes within Graafian follicles in mammals. LHR, luteinizing hormone receptor; EGFR, epidermal growth factor receptor; NPPC, C-type natriuretic peptide; NPR2, natriuretic peptide receptor 2; PDE, phosphodiesterase.

NPPC 通过卵泡的胞外空间扩散, 因此, 壁颗粒细胞中 NPPC 的水平降低, 不仅会导致壁颗粒细胞周围 NPPC 水平的下降, 还会导致卵丘细胞周围 NPPC 水平的降低, 最终使得卵母细胞内 cGMP 水平下调。研究表明, 在猪卵泡中, 激活 LHR 36 h 后, NPPC 和 NPPB 的浓度降到约 20 nmol/L, 而此时卵母细胞几乎全部发生了 GVBD<sup>[34]</sup>, 这说明 NPPC 和 NPPB 浓度的下调能够导致 LH 降低 cGMP 水平。

近期有研究表明, 转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 通过促进颗粒细胞中 NPPC 的表达维持卵母细胞减数分裂的阻滞, 其受体基因 *Tgfr2* 颗粒细胞条件性敲除雌鼠表现为 NPPC mRNA 以及蛋白表达水平显著降低, 这将导致减数分裂难以阻滞在大腔卵泡阶段, 并伴随卵泡发育异常、排卵异常以及生育力严重受损, 而 LH 可通过 TGF- $\beta$  调节颗粒细胞中 NPPC 的含量, 从而诱导卵母细胞减数分裂的恢复<sup>[57]</sup>。

### 3.2.2 LH对NPR2活性的下调作用

研究表明, 在 LH 处理 2~3 h 后, 小鼠卵丘细胞中 NPR2 活性降低, 这与激活表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 信号导致的结果相一致<sup>[58]</sup>。然而, NPR2 活性的下降并非由 NPR2 及 NPPC 的蛋白水平下降导致<sup>[52, 58]</sup>, 而是由于 NPR2 去磷酸化及其与 NPPC 亲和性下降导致的<sup>[58, 59]</sup>。磷蛋白磷酸酶 (phosphoprotein phosphatase, PPP) 家族成员 PP1、PP2A 以及 PP6 介导的 NPR2 去磷酸化使 NPR2 失活, 另一方面, NPR2 与其配体 NPPC 的亲和性降低也会导致 NPR2 失活, 最终使 LH 诱导的减数分裂恢复发生异常 (图 2)。本研究组利用 FAM 标记的 NPPC 检测 NPR2 与其亲和性, 结果表明, 在小鼠卵泡中, LH 通过激活 EGFR 显著增加了卵丘细胞内的钙离子水平, 但是降低了 NPR2 与 NPPC 的亲和性; 在体外培养的 COCs 中, 利用 EGF 激活 EGFR 能够动员卵丘细胞内钙离子水平的升高, 同时降低了 NPR2 与 NPPC 的亲和性以及 cGMP 的水平, 导致卵母细胞减数分裂恢复, 然而, LH 处理并不改变 NPR2 的蛋白水平<sup>[58]</sup>。此外, 去除培养基中的镁离子可以降低 NPR2 与 NPPC 的亲和性, 导致 cGMP 水平降低, 减数分裂恢复<sup>[58]</sup>, 这说明镁离子对 NPR2 正常功能的维持十分重要, 但镁离子具体的作用机制目前还不清楚, 尚需进一步研究。因此, 钙离子可使 NPR2 与其特异性配体 NPPC 的亲和性降低, 导致 NPR2 失活, 但钙离子

是否参与了 NPR2 去磷酸化, 还有待进一步研究。

除以上调控过程, 近期还有研究显示, 雌激素-雌激素受体 (estradiol-estrogen receptors, E2-ERs) 信号通路通过调控 NPPC/NPR2 系统参与了 LH 诱导的减数分裂恢复。研究表明, E2-ERs 直接结合 *Nppc* 及 *Npr2* 启动子上的序列, 促进 *Nppc* 及 *Npr2* 基因的转录, 从而抑制减数分裂恢复, 而 LH 可下调颗粒细胞中 ERs 的表达, 解除 E2-ERs 信号通路的抑制作用, 使卵母细胞恢复减数分裂<sup>[60]</sup>。

### 3.3 LH上调PDE5活性增加cGMP水解

在大鼠与小鼠颗粒细胞中, 有多种 cGMP 磷酸二酯酶表达<sup>[61]</sup>, 目前关于 PDE5 的研究最多, 而近期的研究证实, 在啮齿类动物中, cGMP-PDE5 磷酸化活性增加有利于 LH 诱导减数分裂恢复<sup>[62]</sup>。因此, LH 不但能够使 NPR2 失活, cGMP 水平降低, 还能磷酸化激活 PDE5, 增加 cGMP 水解, 使胞内 cGMP 进一步降低, 导致卵母细胞减数分裂恢复 (图 2)。

### 3.4 激活EGFR对LH下调cGMP水平的作用

LH 通过激活 LHR 发挥作用, 而 LHR 主要表达在壁层颗粒细胞中, 卵丘细胞并不表达 LHR<sup>[63]</sup>, 所以 LH 本质上是通过诱导颗粒细胞中 EGF 样生长因子的表达, 转激活卵丘细胞中的 EGFR, 使卵母细胞恢复减数分裂的, 而 LH 的这一作用则是通过下调 cGMP 水平实现的<sup>[64]</sup>。

内源性的 EGF 样生长因子激活 EGFR 是 LH 降低 cGMP 水平过程中重要的一步, 本研究组的研究显示, LH 可激活 MAPK3/1 以及 Akt, 使环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 磷酸化, 诱导 EGF 样生长因子的表达, EGF 样生长因子激活卵丘细胞中的 EGFR, 促进卵母细胞减数分裂的恢复<sup>[65]</sup>。另外, 在小鼠<sup>[64]</sup>、猪<sup>[66]</sup>的卵巢中, LH 处理可增加 EGF 样生长因子的表达, 激活 EGFR; 在体外培养的小鼠卵泡<sup>[53, 64]</sup>或 NPPC 孵育的猪 COCs<sup>[66]</sup>中, 激活 EGFR 导致减数分裂恢复, 若阻断 EGFR 信号通路, LH 诱导小鼠卵母细胞减数分裂恢复至少延迟 4~6 h, 这一现象同样出现在大鼠、猪以及人体中。

综上所述, 对于几乎所有的哺乳动物来讲, EGFR 信号通路是 LH 诱导卵母细胞减数分裂恢复至关重要的调节者 (图 2)。

### 3.5 LH对缝隙连接的调控作用

LH 可降低卵母细胞与卵丘细胞间缝隙连接的

渗透性,但其具体机制目前并不清楚。Norris 等研究显示, LH 能够通过 MAPK 磷酸化 Cx43, 从而部分抑制颗粒细胞间缝隙连接的渗透性<sup>[13]</sup>, LH 处理 30 min 后缝隙连接渗透性降低, 1 h 后降到最低<sup>[13, 54]</sup>。颗粒细胞间缝隙连接渗透性降低的作用目前尚不清楚, 可能与其对 cAMP 和 cGMP 的渗透率不同有关, 其具体机制有待进一步研究。

#### 4 展望

哺乳动物卵母细胞在胚胎时期就进入减数分裂 I 并持续阻滞, 卵丘颗粒细胞进入到卵母细胞中的 cGMP 是维持减数分裂阻滞的关键因子, cAMP、NPPC/NPR2、IMPDH 等其它多种阻滞因子的作用均与 cGMP 密不可分。减数分裂的恢复需要 LH 峰的诱导, LH 一方面下调 NPPC/NPR2 活性, 使 cGMP 合成减少; 另一方面激活 PDE5, 使 cGMP 水解增加, 最终使卵母细胞内 cGMP 含量降低, 减数分裂得以恢复。此外, LH 还可通过诱导颗粒细胞中 EGF 样生长因子的表达, 进一步激活卵丘细胞中的 EGFR 信号, 降低胞内 cGMP 水平, 使卵母细胞恢复减数分裂。

关于 LH 调控减数分裂恢复的机制, 经过科学家经年的研究, 已较为清楚。然而, 多种减数分裂调控因子如 MARF1、ZAR1/2、DCAF5 等可通过调节卵母细胞内基因组转录、蛋白质合成与降解、纺锤体组装等胞内事件调控减数分裂进程, 这意味着将来对减数分裂调控的研究方向应着眼于细胞内更微细、更深层次的生物过程。目前对 LH 诱导减数分裂恢复的研究显然还不够完善, 今后, 研究者们应力求把 LH 调控减数分裂的研究向着细胞内多种精密生物过程的方向深入推进。对减数分裂阻滞与恢复调控机制的深入研究可为建立更为完善的卵母细胞体外成熟体系、提高卵母细胞体外成熟质量提供理论基础, 同时对多种临床生殖疾病的治疗具有重要的理论与现实意义。

\* \* \*

**致谢:** 感谢中国农业大学生物学院张美佳教授在行文思路及论文写作过程中的帮助及指导。

#### 参考文献

- Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD, Sugimura S, Smits J, Richard FJ, Thompson JG. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction* 2016; 152(5): R143–R157.
- Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, Jaffe LA. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 2004; 306(5703): 1947–1950.
- Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 2010; 330(6002): 366–369.
- Liang CG, Huo LJ, Zhong ZS, Chen DY, Schatten H, Sun QY. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulus-enclosed oocytes. *Endocrinology* 2005; 146(10): 4437–4444.
- Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 356(1–2): 65–73.
- Zhang M, Xia G, Zhou B, Wang C. Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption. *Front Biosci* 2007; 12: 282–296.
- Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 2009; 324(5929): 938–941.
- Liu L, Kong N, Xia G, Zhang M. Molecular control of oocyte meiotic arrest and resumption. *Reprod Fertil Dev* 2013; 25(3): 463–471.
- Zhang M, Xia G. Hormonal control of mammalian oocyte meiosis at diplotene stage. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(8): 1279–1288.
- Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 2010; 140(4): 489–504.
- Griffin J, Emery BR, Huang I, Peterson CM, Carrell DT. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assist Reprod* 2006; 3: 2.
- Darbandi S, Darbandi M, Khorrani KH, Shirazi A, Sadeghi MR, Agarwal A, Al-Hasani S, Naderi MM, Ayaz A, Akhondi MM. Reconstruction of mammalian oocytes by germinal vesicle transfer: A systematic review. *Int J Reprod Biomed (Yazd)* 2017; 15(10): 601–612.
- Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development* 2008; 135(19): 3229–3238.
- Li TY, Colley D, Barr KJ, Yee SP, Kidder GM. Rescue of oogenesis in Cx37-null mutant mice by oocyte-specific

- replacement with Cx43. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 23): 4117–4125.
- 15 Richard S, Baltz JM. Prophase I arrest of mouse oocytes mediated by natriuretic peptide precursor C requires GJA1 (connexin-43) and GJA4 (connexin-37) gap junctions in the antral follicle and cumulus-oocyte complex. *Biol Reprod* 2014; 90(6): 137.
- 16 Cui L, Shen J, Fang L, Mao X, Wang H, Ye Y. Endothelin-1 promotes human germinal vesicle-stage oocyte maturation by downregulating connexin-26 expression in cumulus cells. *Mol Hum Reprod* 2018; 24(1): 27–36.
- 17 Webb RJ, Marshall F, Swann K, Carroll J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Dev Biol* 2002; 246(2): 441–454.
- 18 Hinckley M, Vaccari S, Horner K, Chen R, Conti M. 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(2): 249–261.
- 19 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(1): 196–205.
- 20 Yang CR, Wei Y, Qi ST, Chen L, Zhang QH, Ma JY, Luo YB, Wang YP, Hou Y, Schatten H, Liu ZH, Sun QY. 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(6): e38807.
- 21 DiLuigi A, Weitzman VN, Pace MC, Siano LJ, Maier D, Mehlmann LM. Meiotic arrest in human oocytes is maintained by a Gs signaling pathway. *Biol Reprod* 2008; 78(4): 667–672.
- 22 Oh JS, Han SJ, Conti M. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *J Cell Biol* 2010; 188(2): 199–207.
- 23 Solc P, Saskova A, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J. CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Dev Biol* 2008; 317(1): 260–269.
- 24 Zhao X, Feng C, Yu D, Deng X, Wu D, Jin M, Wang E, Wang X, Yu B. Successive recruitment of p-CDC25B-Ser351 and p-cyclin B1-Ser123 to centrosomes contributes to the release of mouse oocytes from prophase I arrest. *Dev Dyn* 2015; 244(2): 110–121.
- 25 Daldello EM, Luong XG, Yang CR, Kuhn J, Conti M. Cyclin B2 is required for progression through meiosis in mouse oocytes. *Development* 2019; 146(8): dev172734.
- 26 Zhang T, Qi ST, Huang L, Ma XS, Ouyang YC, Hou Y, Shen W, Schatten H, Sun QY. Cyclin B3 controls anaphase onset independent of spindle assembly checkpoint in meiotic oocytes. *Cell Cycle* 2015; 14(16): 2648–2654.
- 27 Vivarelli E, Conti M, De Felici M, Siracusa G. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. *Cell Differ* 1983; 12(5): 271–276.
- 28 Freudzon L, Norris RP, Hand AR, Tanaka S, Saeki Y, Jones TL, Rasenick MM, Berlot CH, Mehlmann LM, Jaffe LA. Regulation of meiotic prophase arrest in mouse oocytes by GPR3, a constitutive activator of the Gs G protein. *J Cell Biol* 2005; 171(2): 255–265.
- 29 Vaccari S, Weeks JN, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod* 2009; 81(3): 595–604.
- 30 Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* 2009; 136(11): 1869–1878.
- 31 Jaffe LA, Egbert JR. Regulation of mammalian oocyte meiosis by intercellular communication within the ovarian follicle. *Annu Rev Physiol* 2017; 79: 237–260.
- 32 Tsuji T, Kiyosu C, Akiyama K, Kunieda T. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. *Mol Reprod Dev* 2012; 79(11): 795–802.
- 33 Kawamura K, Cheng Y, Kawamura N, Takae S, Okada A, Kawagoe Y, Mulders S, Terada Y, Hsueh AJ. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. *Hum Reprod* 2011; 26(11): 3094–3101.
- 34 Zhang W, Yang Y, Liu W, Chen Q, Wang H, Wang X, Zhang Y, Zhang M, Xia G. Brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide maintain porcine oocyte meiotic arrest. *J Cell Physiol* 2015; 230(1): 71–81.
- 35 Franciosi F, Coticchio G, Lodde V, Tessaro I, Modena SC, Fadini R, Dal Canto M, Renzini MM, Albertini DF, Luciano AM. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. *Biol Reprod* 2014; 91(3): 61.
- 36 Zhong Y, Lin J, Liu X, Hou J, Zhang Y, Zhao X. C-Type natriuretic peptide maintains domestic cat oocytes in meiotic arrest. *Reprod Fertil Dev* 2015. doi: 10.1071/RD14425.
- 37 Geister KA, Brinkmeier ML, Hsieh M, Faust SM, Karolyi IJ, Perosky JE, Kozloff KM, Conti M, Camper SA. A novel loss-of-function mutation in *Npr2* clarifies primary role in female reproduction and reveals a potential therapy for acro-



- mesomelic dysplasia, Maroteaux type. *Hum Mol Genet* 2013; 22(2): 345–357.
- 38 Khan S, Ali RH, Abbasi S, Nawaz M, Muhammad N, Ahmad W. Novel mutations in natriuretic peptide receptor-2 gene underlie acromesomelic dysplasia, type maroteaux. *BMC Med Genet* 2012; 13: 44.
- 39 Zhang Y, Wang H, Liu W, Yang Y, Wang X, Zhang Z, Guo Q, Wang C, Xia G. Natriuretic peptides improve the developmental competence of *in vitro* cultured porcine oocytes. *Reprod Biol Endocrinol* 2017; 15(1): 41.
- 40 Wang X, Wang H, Liu W, Zhang Z, Zhang Y, Zhang W, Chen Z, Xia G, Wang C. High level of C-type natriuretic peptide induced by hyperandrogen-mediated anovulation in polycystic ovary syndrome mice. *Clin Sci (Lond)* 2018; 132(7): 759–776.
- 41 Wigglesworth K, Lee KB, O'Brien MJ, Peng J, Matzuk MM, Eppig JJ. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(39): E3723–E3729.
- 42 Yao Q, Cao G, Li M, Wu B, Zhang X, Zhang T, Guo J, Yin H, Shi L, Chen J, Yu X, Zheng L, Ma J, Su YQ. Ribonuclease activity of MARF1 controls oocyte RNA homeostasis and genome integrity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(44): 11250–11255.
- 43 Su YQ, Sugiura K, Sun F, Pendola JK, Cox GA, Handel MA, Schimenti JC, Eppig JJ. MARF1 regulates essential oogenic processes in mice. *Science* 2012; 335(6075): 1496–1499.
- 44 Su YQ, Sun F, Handel MA, Schimenti JC, Eppig JJ. Meiosis arrest female 1 (MARF1) has nuage-like function in mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(46): 18653–18660.
- 45 Zhang J, Zhang YL, Zhao LW, Pi SB, Zhang SY, Tong C, Fan HY. The CRL4-DCAF13 ubiquitin E3 ligase supports oocyte meiotic resumption by targeting PTEN degradation. *Cell Mol Life Sci* 2020; 71(11): 2181–2197.
- 46 Zhang J, Zhang YL, Zhao LW, Guo JX, Yu JL, Ji SY, Cao LR, Zhang SY, Shen L, Ou XH, Fan HY. Mammalian nuclear protein DCAF13 is essential for ovarian follicle maintenance and oocyte growth by mediating rRNA processing. *Cell Death Differ* 2019; 26(7): 1251–1266.
- 47 Yu C, Ji SY, Sha QQ, Sun QY, Fan HY. CRL4-DCAF1 ubiquitin E3 ligase directs protein phosphatase 2A degradation to control oocyte meiotic maturation. *Nat Commun* 2015; 6: 8017.
- 48 Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet* 2003; 33(2): 187–191.
- 49 Rong Y, Ji SY, Zhu YZ, Wu YW, Shen L, Fan HY. ZAR1 and ZAR2 are required for oocyte meiotic maturation by regulating the maternal transcriptome and mRNA translational activation. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(21): 11387–11402.
- 50 Yu C, Fan X, Sha QQ, Wang HH, Li BT, Dai XX, Shen L, Liu J, Wang L, Liu K, Tang F, Fan HY. CFP1 regulates histone H3K4 trimethylation and developmental potential in mouse oocytes. *Cell Rep* 2017; 20(5): 1161–1172.
- 51 Sha QQ, Yu JL, Guo JX, Dai XX, Jiang JC, Zhang YL, Yu C, Ji SY, Jiang Y, Zhang SY, Shen L, Ou XH, Fan HY. CNOT6L couples the selective degradation of maternal transcripts to meiotic cell cycle progression in mouse oocyte. *EMBO J* 2018; 37(24): e99333.
- 52 Egbert JR, Shuhaibar LC, Edmund AB, Van Helden DA, Robinson JW, Uliasz TF, Baena V, Geerts A, Wunder F, Potter LR, Jaffe LA. 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(18): 3594–3604.
- 53 Norris RP, Freudzon M, Nikolaev VO, Jaffe LA. Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. *Reproduction* 2010; 140(5): 655–662.
- 54 Shuhaibar LC, Egbert JR, Norris RP, Lampe PD, Nikolaev VO, Thunemann M, Wen L, Feil R, Jaffe LA. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(17): 5527–5532.
- 55 Liu X, Xie F, Zamah AM, Cao B, Conti M. Multiple pathways mediate luteinizing hormone regulation of cGMP signaling in the mouse ovarian follicle. *Biol Reprod* 2014; 91(1): 9.
- 56 Robinson JW, Zhang M, Shuhaibar LC, Norris RP, Geerts A, Wunder F, Eppig JJ, Potter LR, Jaffe LA. 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(2): 308–316.
- 57 Yang J, Zhang Y, Xu X, Li J, Yuan F, Bo S, Qiao J, Xia G, Su Y, Zhang M. Transforming growth factor-beta is involved in maintaining oocyte meiotic arrest by promoting natriuretic peptide type C expression in mouse granulosa cells. *Cell Death Dis* 2019; 10(8): 558.
- 58 Hao X, Wang Y, Kong N, Zhang Y, Zhao Y, Xia G, Zhang M. 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(2): 45.
- 59 Shuhaibar LC, Egbert JR, Edmund AB, Uliasz TF, Dickey DM, Yee SP, Potter LR, Jaffe LA. 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(1): 194–201.
- 60 Liu W, Xin Q, Wang X, Wang S, Wang H, Zhang W, Yang Y, Zhang Y, Zhang Z, Wang C, Xu Y, Duan E, Xia G. Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes in mammals. *Cell Death Dis* 2017; 8(3): e2662.
- 61 Egbert JR, Uliasz TF, Shuhaibar LC, Geerts A, Wunder F, Kleiman RJ, Humphrey JM, Lampe PD, Artemyev NO, Rybalkin SD, Beavo JA, Movsesian MA, Jaffe LA. 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(5): 110.
- 62 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(1): 6–14.
- 63 Jeppesen JV, Kristensen SG, Nielsen ME, Humaidan P, Dal Canto M, Fadini R, Schmidt KT, Ernst E, Yding AC. LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(8): E1524–E1531.
- 64 Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004; 303(5658): 682–684.
- 65 Wang Y, Hao X, Yang J, Li J, Zhang M. CREB activity is required for luteinizing hormone-induced the expression of EGF-like factors. *Mol Reprod Dev* 2016; 83(12): 1116–1127.
- 66 Zhang W, Chen Q, Yang Y, Liu W, Zhang M, Xia G, Wang C. Epidermal growth factor-network signaling mediates luteinizing hormone regulation of BNP and CNP and their receptor NPR2 during porcine oocyte meiotic resumption. *Mol Reprod Dev* 2014; 81(11): 1030–1041.