

卵泡颗粒细胞维持山羊卵母细胞 减数分裂抑制状态的研究

刘利杰,权富生,刘 军,张 东,刘根胜,张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所,陕西 杨凌 712100)

摘要:通过在卵母细胞体外成熟过程中添加不同浓度的卵丘细胞或其外围壁层颗粒细胞进行共培养,对山羊卵母细胞成熟过程中卵泡颗粒细胞对卵母细胞减数分裂抑制作用及作用机制进行了探索。结果表明,成熟液中添加 10^5 和 10^6 个/mL卵丘细胞或外围壁层颗粒细胞的卵母细胞体外成熟率与对照组相比差异不显著($p > 0.05$),但添加 5×10^6 个/mL(41.2%)和 10^7 个/mL(24.6%)卵丘细胞或外围壁层颗粒细胞组的成熟率显著降低($p < 0.05$);添加 5×10^6 和 10^7 个/mL卵丘细胞组和颗粒细胞组卵丘不能正常扩展,卵母细胞核状态观察,停留在GV期;Rp-cAMP(Rp-cyclic adenosine monophosphothioate)膜渗透性cAMP对抗剂,诱导了 10^7 个/mL的卵丘细胞组(71.6%)和外围壁层颗粒细胞组(71.3%)的卵母细胞体外成熟率与对照组(72.0%)差异不显著($p > 0.05$)。在山羊卵母细胞体外成熟过程中,添加一定浓度的卵丘细胞及其外层的颗粒细胞可以提高卵母细胞胞质内的cAMP的水平,抑制卵母细胞减数分裂的启动,使卵母细胞停留在GV期。

关键词:山羊;卵泡颗粒细胞;卵母细胞;减数分裂;抑制

中图分类号:S826 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)04-0120-05

Maintenance of Meiotic Arrest in Goat Oocyte by Follicular Cells

LIU Li-jie, QUAN Fu-sheng, LIU Jun, ZHANG Dong, LIU Gen-sheng, ZHANG Yong

(Institute of Bio-Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: In this experiment, during the process of goat oocyte IVM, by adding different concentration cumulus cell and its surrounding granular cell, we studied the inhibitive effects and its mechanism of follicular cells on meiosis of oocytes. The IVM rate of oocyte was not being affected considerably after adding 10^5 and 10^6 cell/mL cumulus cells or surrounding granular cells, contrast to control group ($p > 0.05$), but were significantly higher than that of 5×10^6 cell/mL (41.2%), 10^7 cell/mL (24.6%) cumulus cells and 5×10^6 cell/mL (38.5%), 10^7 cell/mL (23.8%) surrounding granular cells ($p < 0.05$). In adding 5×10^6 , 10^7 cell/mL cumulus cells group and surrounding granular cells group, the cumulus could not expand. Nuclear Status Examination, the meiosis of oocytes was maintained in GV stage. Rp-cyclic adenosine monophosphothioate, a membrane-permeable antagonist to cAMP, induced the oocyte IVM rate of 10^7 cell/mL cumulus cells group (71.6%) and surrounding granular cells group (71.3%) which there was no significant difference among the control group ($p > 0.05$). during the process of oocyte IVM, adding some concentration cumulus cells and surrounding granular cells would maintain meiotic arrest by increasing the cAMP level of oocyte, make oocyte stay in the GV stage.

Key words: Goat; Follicular cell; Oocyte; Meiosis; Meiotic arrest

卵母细胞成熟过程受多种因素的调控,包括神经内分泌因子、卵巢的卵泡细胞和间质细胞的自分泌、旁分泌等因子的调节。尽管已经对卵母细胞成熟过程中的影响因素做了大量的研究,但是还存在着许多不明机制。本试验尽量模拟体内环境,通过在卵母细胞体外成熟过程中添加不同浓度的卵丘细

胞或其外围壁层颗粒细胞进行共培养,对山羊卵母细胞成熟过程中,卵泡颗粒细胞对卵母细胞减数分裂抑制作用及作用机制进行了探索。

在卵母细胞体外成熟过程中,卵母细胞从卵泡中分离出来后,它能够自发恢复减数分裂,并达到第二次减数分裂中期,因为此时卵母细胞周围环境发

收稿日期:2008-04-17

基金项目:国有高技术研究与发展计划“863”项目资助(2001AA213081)

作者简介:刘利杰(1983-),男,内蒙古赤峰人,硕士,主要从事动物胚胎工程研究。

通讯作者:张 涌(1956-),男,内蒙古和林格尔人,教授,博士生导师,主要从事哺乳动物胚胎工程研究工作。

生很大的变化,卵丘细胞与外围颗粒细胞之间的间隙连接就被破坏,从而破坏了卵丘-卵母细胞复合体与外围颗粒细胞之间的联系。那么是否由于颗粒细胞的存在而使卵母细胞一直处于减数分裂抑制状态,以延长成熟时间,使卵母细胞的细胞质充分成熟?关于卵丘细胞在卵母细胞体外成熟培养中是否必需,还存在较大的争论。Chang 等研究认为有腔卵泡处于快速生长期,卵母细胞已完成参与调节成熟分裂恢复物质的储备,具有了自发成熟能力^[1]。所以一旦在体外去除卵丘,卵丘细胞对卵母细胞的抑制作用就被解除,卵母细胞自发恢复减数分裂(核成熟)。在卵母细胞成熟过程中,卵丘细胞在提供生长和发育必需的营养物质的时候,是否同时抑制减数分裂的启始尚未统一认识。

目前,已经证明卵母细胞胞质内 cAMP 是维持分裂抑制状态的必需物质^[7-9],胞质中此种核苷酸浓度的下降能够使减数分裂重新启动。Rp-cAMP (Rp-cyclic adenosine monophosphothioate),一种膜渗透性 cAMP 对抗剂,能够对抗 cAMP 对减数分裂的抑制作用。本试验通过在成熟液中添加 Rp-cAMP,对卵丘和颗粒细胞抑制减数分裂的作用机制进行了探索。

近年来,很多生殖生物学家从事体外培养技术的研究,其目的是为发掘卵母细胞的发育潜能。研究者周红林等^[10],马利兵等^[11],用可逆的减数分裂抑制剂使卵母细胞阻滞于 GV 期,从而使卵母细胞获得一定的预成熟时间,以此模拟卵母细胞的体内获能过程。但结果差异大,甚至相互矛盾。本试验通过体外的研究,揭示了在有腔卵泡阶段,卵母细胞周围卵泡细胞对其的减数分裂抑制作用及作用机理。希望能为今后的卵母细胞体外培养技术研究开阔思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 卵巢的采集 卵巢采集于西安市大型屠宰场。山羊被宰杀后,剖腹取出卵巢,放于 30~32 加有青霉素、链霉素的生理盐水中,在 3~5 h 内送至实验室进行试验。

1.1.2 卵母细胞的采集 收集到的卵巢先剪去附着的系膜和输卵管,用 75% 的酒精冲洗后用灭菌生理盐水洗涤 3~5 次,放入盛有含 5% FBS (Fetal-bovine serum) (Gibco, Paisley, Scotland, U. K) 的 PBS 中,切割法收集卵母细胞。将检出的卵丘卵母细胞复合体 (Cumulus oocyte complexes, COCs) 分为 A、B、C 三级:A 级,卵丘细胞完整,卵母细胞胞质均匀;B

级,卵丘细胞不完整,卵母细胞胞质均匀;C 级,卵母细胞裸露,或胞质略有退化。选择 A、B 级进行培养。

1.1.3 主要试剂 除特别说明外均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 COCs 的体外成熟 将收集的 A 级和 B 级 COCs 在 D-PBS 中洗 3 次,再经卵母细胞成熟培养液:9.5 g/L M199 + 10 mmol/L Hepes + 1 mmol/L 丙酮酸钠 + 25 mmol/L 谷氨酰胺 + 1 U/mL 促黄体素 (LH) (宁波制药) + 0.2 U/mL 促卵泡素 (FSH) (宁波制药) + 1 μ g/mL 17-雌二醇 (17-E₂) + 10% FBS 洗 3 次,每 50 个 COCs 置于装有 800 mL 成熟液的 30 mm U 形培养皿中成熟培养 24~26 h,培养条件为 38.5 \pm 0.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 和饱和湿度。

1.2.2 卵母细胞的成熟鉴定 将培养 24 h 的卵母细胞用 D-PBS 液清洗 3 遍,放入含有 0.1% 透明质酸酶的 D-PBS 液内,用毛细玻璃管轻轻吹打以除去卵丘细胞。在体视显微镜下,以异物针拨动卵母细胞进行观察,排出第一极体的定为成熟,否则定为不成熟。

1.2.3 卵丘细胞的获取与处理 将 COCs 置于培养皿中,用毛细管去除卵丘细胞后,残液以 1 500 r/min,离心 2 次,充分悬浮。调整密度分别为 10⁵, 10⁶, 5 \times 10⁶, 10⁷ 个/mL 的培养液。

1.2.4 外围颗粒细胞的获取和处理 捡卵时,选取 COC 外围围绕大片颗粒细胞的颗粒细胞-卵丘细胞-卵母细胞复合体 (图 1),用毛细玻璃管轻轻吹打以除去外围颗粒细胞,卵母细胞胞质均匀的 COCs 进行培养,残液以 1 500 r/min,离心 2 次,充分悬浮。调整密度分别为 10⁵, 10⁶, 5 \times 10⁶, 10⁷ 个/mL 的培养液。

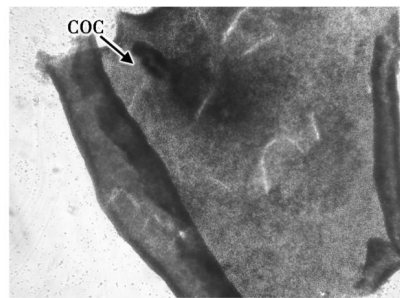


图 1 COC 外层围绕大片颗粒细胞

Fig.1 Granular cell surround COC

1.2.5 核相评估 以 PI 染色染色体,利用免疫法 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 来标定纺锤体微管。用 4% 多聚甲醛于室温下将卵母细胞固定 3 h,在 0.3% TritonX-100 及 3% BSA 的 PBS 中于 4 $^{\circ}$ C 过夜。然后在含有 100 mmol/L 甘氨酸和 3% BSA 的 PBS 中封闭 4 h。卵母细胞在 1 400 稀释的小鼠抗-微

管蛋白的一抗中 37 ℃温育 3 h,在 0.1 % Tween-20 和 0.01 % TritonX-100 的 PBS 液漂洗 3 遍。然后在 1∶100 稀释的 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 中 37 ℃避光温育 3 h,再用封闭液漂洗 3 遍。接着在 10 μg/mL PI 中染色 5 min。过多的抗体和染料在 0.01 % Tween-20 中清洗 15 min。最后将卵母细胞移到载玻片上,用荧光猝灭剂封闭盖玻片后放入暗盒于 4 ℃保存,通过激光共聚焦显微镜观察和显微照像。细胞核状态通过观察微管的组装和染色体构型判断。

1.3 数据分析

所有试验重复 3 次以上,试验数据用 χ^2 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

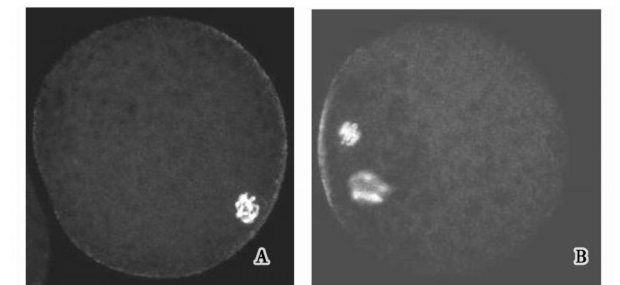
2.1 添加不同浓度卵丘细胞对 COC 体外成熟的影响

对照组培养液中不添加卵丘细胞, 组、 组、

表 1 培养液中添加不同浓度卵丘细胞对 COC 体外成熟的影响
Tab.1 Effect of different concentration cumulus cells on oocyte IVM

组别	对照组 (0)	(10 ⁵)	(10 ⁶)	(5 ×10 ⁶)	(10 ⁷)
卵母细胞数/(个/mL)	150	132	148	136	142
体外成熟卵母细胞数(成熟率/%)	108(72.0) a	93(70.5) a	102(68.6) a	56(41.2) b	35(24.6) c

注:同一行中标注不同字母表示差异显著 (p < 0.05)。下同。
Note :Figures with different letters in the same line show significant difference ,p < 0.05. The same as follows.



A. 在卵母细胞体外培养过程中添加一定浓度卵丘细胞或颗粒细胞,卵母细胞减数分裂受到抑制,维持在 GV 期 (×200);B. 对照组,成熟后处于第二次减数分裂中期的卵母细胞 (×200)。
A. A typical image of oocyte arrested at the GV stage after cumulus cells or granular cells treatment (×200);B. Control. A typical image of oocyte at the MII stage (×200) .

图 2 山羊卵母细胞核状态观察

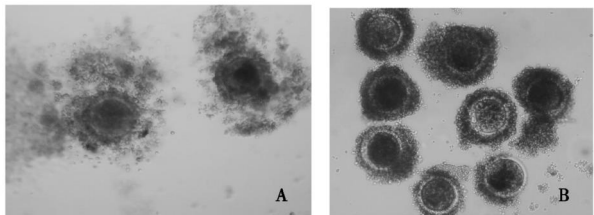
Fig.2 Nuclear status examination of goat oocyte

2.2 添加不同浓度的外围颗粒细胞对 COC 体外成熟的影响

对照组培养液中不添加颗粒细胞, 组、 组、 组和 组培养液中分别添加浓度为 10⁵, 10⁶, 5 ×10⁶, 10⁷ 个/mL 的颗粒细胞。COCs 体外成熟培养 24 ~ 26 h 后,颗粒细胞贴于培养皿壁。由表 2 可见,对照组、 组和 组的成熟率差异不显著 (p > 0.05),但显著高于 组和 组 (p < 0.05); 组卵母细胞的体外成熟率显著高于 组 (p < 0.05)。如图 2-A 所示,添加 5 ×10⁶, 10⁷ 个/mL 的颗粒细胞,卵母

组和 组培养液中分别添加浓度为 10⁵, 10⁶, 5 ×10⁶, 10⁷ 个/mL 的卵丘细胞。COCs 体外成熟培养 24 ~ 26 h 后,卵丘细胞贴于培养皿壁,结果见表 1,由表 1 可知,对照组、 组和 组的成熟率差异不显著 (p > 0.05),而显著高于 组和 组的成熟率 (p < 0.05); 组卵母细胞的体外成熟率显著高于 组 (p < 0.05)。添加 5 ×10⁶, 10⁷ 个/mL 的卵丘细胞,卵母细胞减数分裂受到抑制,被抑制在 GV 期,如图 2-A 所示,减数分裂不能重新启动。结果表明,体外成熟培养液中添加低浓度的卵丘细胞对卵母细胞的体外成熟没有显著影响,而添加高浓度的卵丘细胞能显著抑制卵母细胞的体外成熟;而在卵母细胞成熟过程中,卵丘细胞在为卵母细胞提供生长和发育必需的营养物质的同时可能参与防止减数分裂的重新启动。

细胞减数分裂受到抑制,停留在 GV 期。结果表明,体外成熟培养液中添加低浓度的颗粒细胞对卵母细胞的体外成熟没有显著影响,而添加高浓度的颗粒细胞能显著抑制卵母细胞的体外成熟。



A. 对照组:成熟后 COC 卵丘正常扩展 (×40);B. 在卵母细胞体外培养过程中添加 5 ×10⁶, 10⁷ 个/mL 的卵丘细胞或颗粒细胞,卵丘扩展受到抑制 (×40)。
A. Control :The expansion of the cumulus mass after IVM COCs (×40) ;B. Without cumulus expansion after cumulus cells or granular cells treatment (×40) .

图 3 山羊卵母细胞卵丘扩展程度观察

Fig.3 Cumulus expansion examination of goat oocyte

2.3 添加卵丘细胞或颗粒细胞对卵丘扩展的影响

促黄体素诱导卵母细胞成熟的同时,卵母细胞周围的卵丘发生扩展并向胞外分泌粘液样的细胞外物质。卵丘扩展一直被认为可能参与了卵母细胞减数分裂恢复的调节^[12]。可在培养液中添加 5 ×10⁶, 10⁷ 个/mL 卵丘细胞或颗粒细胞,COCs 成熟培养 24 ~ 26 h,不仅卵母细胞的成熟受到抑制,而且卵丘扩展受

到抑制(图 3-B),而在培养液中不添加卵丘细胞或颗粒细胞的对照组及添加 10^5 和 10^6 个/mL 卵丘细胞或颗粒细胞组卵丘正常扩展(图 3-A)。

表 2 培养液中添加不同浓度颗粒细胞对 COC 体外成熟的影响

Tab. 2 Effect of different concentration granular cells on oocyte IVM

组别	对照组(0)	(10^5)	(10^6)	(5×10^6)	(10^7)
卵母细胞数/(个/mL)	134	136	140	128	128
体外成熟卵母细胞数(成熟率/%)	96(71.6) a	96(70.5) a	97(69.3) a	49(38.2) b	31(24.2) c

2.4 Rp-cAMP 对抗卵丘细胞或颗粒细胞对 COC 成熟的抑制作用

对照组培养液中不添加颗粒细胞和 Rp-cAMP, 组培养液中添加 1 mmol/L Rp-cAMP, 组添加浓度为 10^7 个/mL 的卵丘细胞、组培养液中添加浓度为 10^7 个/mL 的颗粒细胞, 组和组在含有 1 mmol/L Rp-cAMP 的培养液中分别添加浓度为

10^7 个/mL 的卵丘细胞和颗粒细胞。COC 体外成熟培养 24 ~ 26 h 后,结果见表 3。由表 3 可知,对照组和组的成熟率差异不显著。组和组的成熟率与对照组相比差异显著($p < 0.05$), 组和组的成熟率与对照组相比差异不显著($p > 0.05$)。结果表明 Rp-cAMP 对抗了卵丘细胞或颗粒细胞对卵母细胞成熟的抑制作用。

表 3 Rp-cAMP 对抗卵丘细胞或颗粒细胞对 COC 成熟的抑制作用

Tab. 3 Effect of Rp-cAMP anti-meiosis-arresting of cumulus cell and granular cell to COC

组别	对照组					
卵母细胞数/(个/mL)	100	102	98	104	102	108
体外成熟卵母细胞数(成熟率/%)	72(72) a	74(72.5) a	23(23.5) b	25(24.0) b	73(71.6) a	77(71.3) a

3 讨 论

减数分裂早在卵子发生时期就已经开始,但并没有超越前期,直到从脑垂体分泌的促黄体素作用于卵母细胞周围的卵泡内的体细胞。在卵母细胞生长期及前期,由于卵母细胞自身内部因素减数分裂被抑制。然而,当卵母细胞长到足够大小并且卵泡已发育到在卵母细胞于卵泡内体细胞之间产生腔体的有腔卵泡阶段,另一种抑制减数分裂的机制开始起作用。此时如果卵母细胞从卵泡中分离,将自发恢复减数分裂,因此得出维持减数分裂抑制需要从卵泡细胞产生的抑制信号^[8]。本试验发现:在卵母细胞体外成熟过程中,当在培养液中添加卵丘细胞或颗粒细胞浓度达到 5×10^6 个/L 时,能显著抑制卵母细胞的体外成熟,并且维持未成熟的卵母细胞在 GV 期。作为判断卵母细胞体外成熟的一个标准,人们十分重视卵丘扩展程度。例如, Hunter 等^[13]根据卵丘细胞扩展的程度制定了牛卵母细胞体外成熟的判断标准。在人、猪、小鼠、大鼠和绵羊等动物,常常把卵丘扩展和粘液化作为卵母细胞体外成熟的形态指标之一,卵丘扩展发生在排卵前后,确切时间根据动物种类的不同而异,扩展的同时也破坏了卵丘细胞和卵母细胞间的通讯联系。所以,卵丘扩展可能参与了卵母细胞减数分裂恢复的调节。试验同时发现在培养液中添加卵丘细胞或颗粒细胞,不仅卵母细胞的成熟受到抑制,而且卵丘扩展受到抑制。说明卵泡细胞产生的抑制信号抑制了卵母细胞的成

熟,这可能与体内的情况相似。

卵母细胞胞质内相对高含量的 cAMP 是维持减数分裂抑制状态的必需物质,试验过程中,当添加一定浓度的卵泡细胞就能够降低卵母细胞体外成熟率,抑制减数分裂,然而在此同时添加 1 mmol/L Rp-cAMP,能够解除卵泡细胞对减数分裂的抑制状态。Rp-cAMP 一种膜渗透性 cAMP 对抗剂,能够对抗高水 cAMP 对减数分裂的抑制作用。说明卵丘细胞和颗粒细胞通过提高胞质内 cAMP 水平抑制卵母细胞减数分裂的重新启动。在卵母细胞成熟过程中,相对高含量的 cAMP 能够维持卵母细胞减数分裂的抑制,但关于抑制剂 cAMP 的来源问题一直是争论的焦点。一种观点认为 cAMP 是卵母细胞本身产生的^[14,15],可另一种观点则认为减数分裂的抑制依赖于卵丘细胞和颗粒细胞提供的 cAMP^[16,17]。依据第一种观点,卵泡颗粒细胞产生一种配体,维持卵母细胞表面受体 GPR3(G 蛋白偶联受体)的活性,活化 GPR3 偶联的 Gs 蛋白, Gs 蛋白激活卵母细胞内腺苷酸环化酶,产生 cAMP。在这种情况下,卵母细胞的自发成熟是由于当卵母细胞从卵泡中游离出来缺少由颗粒细胞产生的能够活化 Gs 蛋白的配体。第二种观点提出 cAMP 由围绕在卵母细胞周围的卵丘细胞和外周的颗粒细胞产生通过间隙连接传递到卵母细胞内,因此抑制了减数分裂。这种假说进一步提出:促黄体素诱导卵母细胞成熟发生在缝隙连接介导的卵母细胞与周围卵泡细胞间通讯中断之后,而促性腺激素刺激其发生。根据这种假设,卵母

细胞从卵泡中释放后引起的自发成熟实际上是模仿了 LH 的作用, 卵泡细胞向卵母细胞提供 cAMP 被中断。这些假设还有待于进一步的验证。

细胞质和细胞核完全成熟是由卵母细胞获得的胚胎能够继续发育的基础。而对于本试验的发现, 可能揭示了在山羊卵母细胞成熟过程中, 卵泡细胞即卵母细胞周围的卵丘细胞和外围壁层颗粒细胞通过提高卵母细胞胞质内的 cAMP 的水平, 抑制卵母细胞减数分裂的启动, 以延长 GV 期, 使细胞质充分成熟, 卵母细胞完成了物质储备过程而具有充分的潜能完成合子的后期发育。

参考文献:

- [1] Granot I, Dekel N. The ovarian gap junction protein connexin 43: regulation by gonadotropins [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, 13: 310 - 313.
- [2] Cross P C, Brinster R L. Leucine uptake and incorporation at three stage of mouse oocyte maturation [J]. *Exp Cell Res*, 1974, 86: 43 - 46.
- [3] Brower P T, Schultz R M. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth [J]. *Dev Biol*, 1982, 90: 144 - 153.
- [4] Larson W J, Wert S E, Brunner C I D. A dramatic loss of differential modulation of rat follicle cell gap-junction population at ovulation [J]. *Dev Biol*, 1987, 122: 61 - 71.
- [5] De Loos F, Kastrop P, Maurik P. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complex. *Mol [J]. Reprod Dev*, 1991, 28: 255 - 259.
- [6] Chang M C. The maturation of rabbit oocyte in culture and their maturation activation fertilization and subsequent development in the fallopian tubes [J]. *J Exp Zool*, 1955, 128: 379 - 399.
- [7] Conti M C B, Andersen F, Richard C, *et al.* Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187: 153 - 159.
- [8] Eppig J J, Viveiros M, Marini-Bivens C. Regulation of mammalian oocyte maturation [M]// Leung P C K, Adashi E Y. *The Ovary*. Second edition. Elsevier/ Academic Press, San Diego, 2004: 113 - 129.
- [9] Mehlmann L M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation [M]. *Reproduction*. In press, 2005.
- [10] 周红林, 马峻, 季维智. 绵羊卵母细胞体外核成熟抑制及其对胚胎发育潜力的影响 [J]. *动物学报*, 2002, 48 (6): 741 - 748.
- [11] 马利兵, 华松, 曹俊伟, 等. 磷酸二酯酶抑制剂对山羊卵母细胞体外成熟及孤雌胚发育的影响 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2007, 35 (2): 7 - 10.
- [12] Downs S M, Schroeder A C, Eppig J J. Serum maintains the fertilizability of mouse oocyte matured in vitro by preventing hardening of the zona pellucida [J]. *Gamete Res*, 1986, 15: 115 - 221.
- [13] Hunter R H F, Flechon B, Flechon J E. Pre- and peri-ovulatory redistribution of viable spermatozoa in the oviduct: a scanning electron microscope study [J]. *Tissue and Cell*, 1987, 19: 423 - 436.
- [14] Horner K, Livera G, Hinckley M, *et al.* Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest [J]. *Dev Biol*, 2003, 258: 385 - 396.
- [15] Mehlmann L M, Saeki Y, Tanaka S. The G α -linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes [J]. *Science*, 2004, 306: 1947 - 1950.
- [16] Dekel N, Lawrence T S, Glula N b. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH [J]. *Dev Biol*, 1981, 86: 356 - 362.
- [17] Sagit Sela-Abramovich, Iris Edry, Dalia Galiani. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation [J]. *Endocrinology*, 2006, 147 (5): 2280 - 2286.