

FSH 激活的 ERK1/2 信号通路在 GC 细胞增殖分化过程中的作用

章 平, 张自富*

(信阳农林学院, 河南 信阳 464000)

摘要: 为探明由促卵泡刺激素(FSH)激活的胞外信号调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)通路在颗粒细胞(GC)增殖分化过程中的作用,以分离培养的 SD 大鼠 GC 为材料,研究了 FSH 激活的 ERK1/2 通路对 GC 增殖和分化的影响。结果显示:FSH 快速诱导了 ERK1/2 的磷酸化,这种诱导作用具有时间依赖性,FSH 作用 0.33 h 时其磷酸化水平达到最高,用磷酸蛋白激酶 A(PKA)的特异性抑制剂 H89 抑制 PKA 活性,显著降低了 FSH 和腺苷酸环化酶激活剂(forskolin)对 ERK1/2 的激活作用。以增殖细胞核抗原(PCNA)为 GC 增殖指标,以甾体生成快速调节蛋白(StAR)和甾体生成成为 GC 分化指标,检测发现 50 ng/mL 的 FSH 以时间依赖方式诱导了 PCNA 蛋白的表达,FSH 处理 2 h,PCNA 蛋白水平达到最高;用 UO126(ERK1/2 的特异性抑制剂)阻断 ERK1/2 通路发现,FSH 对 PCNA 和甾体生成的促进作用明显减弱;激光共聚焦检测结果进一步显示,与对照组相比,FSH 组 StAR 信号明显增强,抑制 ERK1/2 活性显著降低了 StAR 的荧光强度。可见,FSH 激活的 ERK1/2 通路促进了 PCNA 和甾体的生成,诱导了 GC 的增殖和分化。

关键词: 促卵泡刺激素;颗粒细胞;细胞增殖;ERK1/2 通路;甾体生成快速调节蛋白;增殖细胞核抗原

中图分类号: Q291 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)08-0120-06

Study on the Role of Activation of ERK1/2 by FSH in Proliferation and Differentiation of Granulosa Cells

ZHANG Ping, ZHANG Zi-fu*

(Xinyang College of Agriculture and Forestry, Xinyang 464000, China)

Abstract: In order to investigate the effect of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) pathway activated by the follicle-stimulating hormone (FSH) in granulosa cell (GC) proliferation and differentiation, the isolated and cultured rats' GCs were used to study the effects of FSH activated ERK1/2 pathway on GC proliferation and differentiation. The results showed that FSH rapidly induced phosphorylation of ERK1/2 in time-dependent manner, which achieved the highest level of phosphorylation in 0.33 h. A specific inhibitor of protein kinase A (PKA) named H89 inhibited the PKA activity, significantly reducing the activation of FSH and forskolin (adenylate cyclase activator) on ERK1/2. With proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a GC proliferation indicator, steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and steroid production as GC differentiation indicators, the detection results showed that 50 ng/mL of FSH induced the expression of PCNA protein by the way of time-dependent. PCNA protein levels were highest

收稿日期: 2014-02-12

基金项目: 信阳农林学院博士基金项目(201201020)

作者简介: 章 平(1971-), 女, 河南新县人, 讲师, 本科, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: xyzhangp@126.com

* 通讯作者: 张自富(1974-), 男, 河南信阳人, 讲师, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖和动物转基因研究。

E-mail: zzf5205@126.com

when FSH treated for 2 h. When blocking ERK1/2 pathway with UO126 (specific inhibitor of ERK1/2), FSH's effects on PCNA and production of steroid were significantly weakened. Confocal results showed that, compared with the control group, StAR signal enhanced markedly in FSH group, and the fluorescence intensity of StAR was reduced significantly after the ERK1/2 activity was inhibited. In conclusion, ERK1/2 pathway activated by FSH promoted the generation of PCNA and steroids and induced GC proliferation and differentiation.

Key words: FSH; GC; cell proliferation; ERK1/2 pathway; StAR; PCNA

哺乳动物卵泡主要由3类细胞构成,即位于卵泡中央的卵母细胞、位于卵母细胞周围的颗粒细胞(granulosa cell, GC)及位于卵泡最外层的膜细胞(theca cell, TC)。卵泡的生长启动和早期卵泡的发育不受促卵泡刺激素(FSH)的调控,但是在卵泡发育的中后期,特别是在排卵前卵泡的发育依赖于FSH。基因敲除试验证实,将小鼠FSH β 亚基或GC上的FSH受体基因敲除后,卵泡发育停滞在窦前阶段^[1]。另外,在卵泡细胞中只有GC表达FSH受体,因此,FSH对卵泡发育的调节是通过GC实现的,即FSH通过诱导GC的增殖分化来调控卵泡的发育。FSH作用于GC,一方面促进与增殖相关基因的表达,激活相应蛋白激酶,如周期蛋白依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent protein kinase, CDK)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和周期蛋白(cyclin D_2)^[2];另一方面诱导与分化相关基因的表达,如细胞色素P450芳香化酶(cytochrome P450 aromatase, P450arom)、肝受体类似物(liver receptor homologue, LHR)、细胞色素P450胆固醇侧链裂解酶(cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450, P450scc)、 3β -羟甾醇脱氢酶(3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3β -HSD)^[3]等,使GC具有合成甾类激素的能力。到目前为止,尽管对GC增殖分化进行了多年的研究,但其分子作用机制尚不清楚。

研究发现,FSH通过环腺嘌呤核苷蛋白激酶A(adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate-protein kinase A, cAMP-PKA)通路促进GC增殖分化,即FSH通过G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)激活腺苷酸环化酶,后者提高了细胞内cAMP水平, cAMP激活磷酸蛋白激酶A(PKA), PKA通过磷酸化下游分子诱导增殖分化基因的表达^[4]。但是cAMP-PKA通路并不能完全解释FSH对细胞增殖分化的作用,而且在GC增殖分化过程中,许多基因不含有cAMP反应元件,不受PKA调节。由此可推测出,FSH活化的其他信号通路可能与PKA一起参与GC的增殖和分化过程。Moore等^[5]研究表明,除PKA外,FSH还能激活有

丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路如胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)、细胞色素P38有丝分裂原活化蛋白激酶(cytochrome p38 mitogen-activated protein kinases, p38 MAPK)通路。Marshall^[6]研究发现,ERK1/2通路介导的胞外信号对细胞增殖分化具有诱导作用。另有研究^[7-8]显示,MAPK通过磷酸化下游分子促进目的基因表达,进而刺激细胞增殖和分化。以上研究表明,激活的ERK1/2通路可能参与了FSH对GC增殖分化的调节过程。

甾体生成快速调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR)是甾体生成的限速蛋白,负责将胆固醇跨膜运输到线粒体内膜^[9]。PCNA是一种细胞增殖相关蛋白,参与DNA的合成^[10], Hall等^[11]研究证实,PCNA蛋白可作为细胞增殖的一种检测指标。在卵泡发育过程中,PCNA可以作为早期卵泡细胞增殖的标志分子:在初级卵泡的形成阶段可检测到PCNA蛋白分子,其水平随着卵泡发育而增加,特别是在促性腺激素的作用下增加更为明显^[12]。在卵泡发育过程中FSH激活的ERK1/2通路在GC增殖分化过程中的作用并不明确,本研究以StAR和甾体生成为GC分化指标,以PCNA为GC增殖指标,分析FSH对GC增殖分化的影响,以期探明FSH在GC增殖分化过程中的作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

FSH、Taq DNA聚合酶购自大连宝生物工程有限公司;PCR引物由北京赛百盛公司合成;孕酮、雌激素放射免疫测定试剂盒购自北京北方生物技术研究所;McCoy's 5a培养基、腺苷酸环化酶激活剂(forskolin)、PKA的特异性抑制剂(H89)、ERK1/2的特异性抑制剂(UO126)、 β -actin单克隆抗体购自Sigma公司;磷酸化ERK1/2抗体、细胞色素P44/42 MAPK抗体购自New England Biolabs公司;PCNA抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司;

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; StAR 抗体由美国 D. M. Stocco 教授惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 颗粒细胞的分离和原代培养 对 23 日龄 SD 雌性大鼠皮下注射己烯雌酚(DES)[0.5 mg/(只·d), 溶于花生油中], 连续注射 3 d, 第 4 天用颈椎脱臼法处死, 取出卵巢, 用 McCoy's 5a 培养液(含 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)冲洗后, 在培养皿中于实体解剖镜下用 25 号针头刺破卵泡, 加入少量培养液, 收集后经 1 000 r/min 离心 5 min, 收集 GC 细胞。培养液清洗 2 次, 然后取 50 μL 细胞悬浮液, 加入 50 μL 曲利本蓝(0.4 g/L)混匀后, 用血球计数板测定活细胞数目。接种密度标准为: 放免分析试验 5×10^5 个/孔、激光共聚焦试验 2×10^5 个/片、蛋白印迹试验 2×10^6 个/孔、RT-PCR 试验 $3 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个/孔。细胞培养条件为 37 ℃、CO₂ 体积分数 5%。试验使用的培养液均为无血清培养液。

1.2.2 FSH 激活 ERK1/2 作用的测定 将分离培养的 GC 按 2×10^6 个/孔的接种密度接种, 用无血清 McCoy's 5a 培养基 37 ℃培养过夜。用 50 ng/mL 的 FSH 处理 GC 0~72 h; 再分别用 10 μmol/L 的 H89 或 UO126 处理 20 min, 最后用 50 ng/mL 的 FSH 或 50 μmol/L 的 forskolin 处理 20 min。同时以正常培养的细胞为对照(下同)。培养完毕后, 裂解细胞, 提取蛋白质, 用磷酸化细胞色素 P44/42 MAPK 抗体和总 ERK1/2 的抗体进行蛋白质印迹分析(Western blotting)。每批次取 20 μg 蛋白质样品, 加入等体积的 2×SDS 凝胶上样缓冲液后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳; 电泳直至溴酚蓝到达分离胶的底部, 断开电源, 进行转膜; 电转移 2~3 h 后, 根据硝酸纤维素膜面积加入封闭液(含 5% 脱脂奶粉、0.05% Tween 20 的 PBS), 室温下摇床上封闭 1 h, 然后加入一抗温浴 2 h 或者 4 ℃过夜, 弃抗体, 用 PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min; 用辣根过氧化物酶标记的抗体室温孵育 1 h, 之后 PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 除去未结合的二抗; 加入化学发光底物孵育 5 min, 经 X 光片曝光得到特异条带。

1.2.3 FSH 对 GC 表达 PCNA 的影响测定 用 50 ng/mL 的 FSH 处理 GC 0~24 h。于不同时间点裂解细胞, 提取蛋白质, 用 PCNA 抗体进行 Western blotting, 检测 PCNA 蛋白水平的变化, β-actin 蛋白作为内参, 最后对特异蛋白质条带密度扫描和定量。每个试验重复 3 次。

1.2.4 ERK1/2 活性对 FSH 诱导 PCNA 及甾体生

成的影响检测 分别用 H89(10 μmol/L) 或 UO126(10 μmol/L) 处理 GC 20 min, 再用 50 ng/mL 的 FSH 处理 2 h。裂解细胞, 提取蛋白质, 用 PCNA 抗体进行 Western blotting, 检测 PCNA 蛋白水平的变化, 方法同上。每个试验重复 3 次。

分别用 H89(10 μmol/L) 或 UO126(10 μmol/L) 处理 GC 20 min, 再用 50 ng/mL 的 FSH 处理 48 h。收集培养液, 用放射免疫(RIA)检测孕酮和雌激素水平的变化。按常规孕酮(P₄)、雌二醇(E₂)放射免疫法进行测定后, 用 Multiscan 数据分析软件绘制标准曲线, 分析样品激素含量。

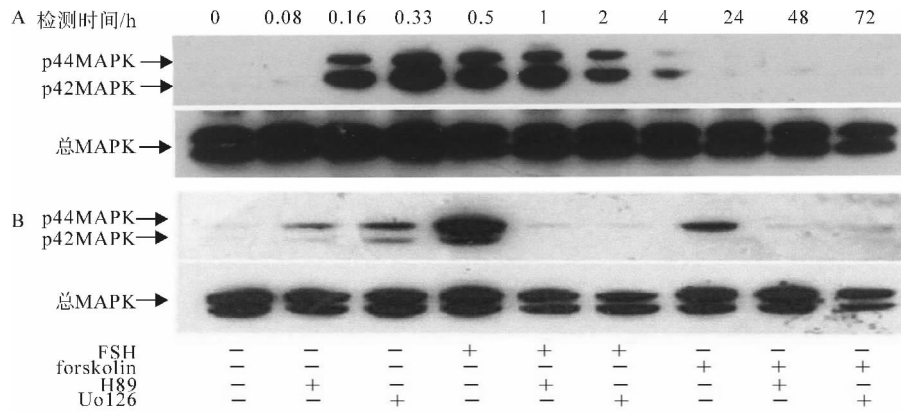
1.2.5 UO126 对 FSH 诱导 StAR 表达的影响测定 分别用 10 μmol/L 的 H89 或 UO126 处理 GC 20 min, 再用 50 ng/mL 的 FSH 处理 48 h。同时以正常培养的细胞为对照。收集培养液, 用 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min、2% 的山羊血清封闭 1 h, 再用兔源的 StAR 抗体(1:200) 4 ℃孵育过夜, 最后用荧光素标记的山羊抗兔 IgG 抗体温育 1 h, 于激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.6 数据处理 运用统计分析软件 SPSS 10.0 对数据进行处理, 用 One-way ANOVA 方法评估组间差异, 数据结果表示为平均值±标准差, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 FSH 以时间和 PKA 依赖方式激活 ERK1/2

Western blotting 结果显示, 用质量浓度为 50 ng/mL 的 FSH 处理 GC 之后, 快速引起 ERK1/2 的磷酸化, 并且这种诱导作用呈现时间依赖性关系, 加入 FSH 作用 0.16 h 之后, 就可以检测到 ERK1/2 的磷酸化; 加入 FSH 作用 0.33 h 时, ERK1/2 的磷酸化水平达到最高值, 之后逐渐降低。用磷酸化的 ERK1/2 抗体和非磷酸化的 ERK1/2 抗体分别检测该蛋白激酶表达量的变化, 试验结果显示, FSH 不影响 ERK1/2 的表达量, 只改变其活性状态(图 1A)。用 50 μmol/L 的 forskolin 处理 GC, 也能激活 ERK1/2 表达, 提示 FSH 对 ERK1/2 的激活作用依赖于 cAMP(图 1B)。为了进一步研究 FSH 激活 MAPK 的特异性变化, 先用 H89(10 μmol/L) 和 UO126(10 μmol/L) 分别处理 GC, 再用 FSH(50 ng/mL) 作用, 检测结果显示, H89 和 UO126 显著抑制了 FSH 和 forskolin 对 ERK1/2 的活化作用(图 1B)。以上试验结果显示, FSH 以时间依赖方式激活 ERK1/2, cAMP 和 PKA 介导了 FSH 对 ERK1/2 的激活作用。该结果与以前的报道一致^[13]。

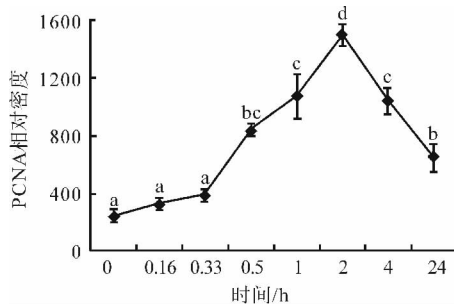


A. 用 FSH 处理 GC; B. PKA 和 ERK1/2 抑制剂处理 GC 后,再用 FSH 和 forskolin 处理 (“+”表示被激活;“-”表示被抑制)

图 1 FSH 激活 ERK1/2 的作用方式

2.2 FSH 对 PCNA 表达的影响

用质量浓度为 50 ng/mL 的 FSH 处理 GC 0~24 h 后,Western blotting 检测 PCNA 蛋白的表达量。对照组 PCNA 蛋白的表达水平很低,随作用时间的延长未呈现出明显变化,试验结果与早期卵泡细胞的增殖速度缓慢规律相符合;FSH 处理显著提高了 PCNA 蛋白的表达水平,而且这种诱导作用呈现出典型的时间依赖性关系,具体表现为:PCNA 蛋白表达水平先随 FSH 作用时间的延长而逐渐升高,作用 0.5 h 时达到显著水平($P<0.05$),作用 2 h 时 PCNA 蛋白表达水平达到最高,随后缓慢降低(图 2)。



不同字母代表差异显著($P<0.05$),下同

图 2 FSH 对 PCNA 表达水平的影响

2.3 ERK1/2 活性对 FSH 诱导 PCNA 及甾体生成的影响

为了探明 FSH 活化的 ERK1/2 通路是否参与了 PCNA 的表达调控,用 ERK1/2 的特异性抑制剂 UO126 阻断了 ERK1/2 通路,然后检测 PCNA 蛋白的表达变化。当单独使用 UO126 时,PCNA 蛋白的表达量无明显变化(图 3)。另外又测定了 ERK1/2 通路对 GC 甾体生成的影响,向培养液中加入 UO126 时,降低了 FSH 对孕酮和雌激素生成

的诱导作用($P<0.05$)(图 4)。用 H89 抑制 PKA 活性时发现,FSH 对 PCNA 和甾体生成的促进作用明显减弱(图 3、4)。

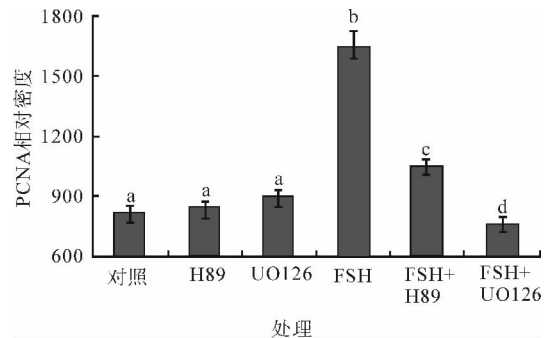


图 3 H89 和 UO126 对 FSH 诱导 PCNA 表达的影响

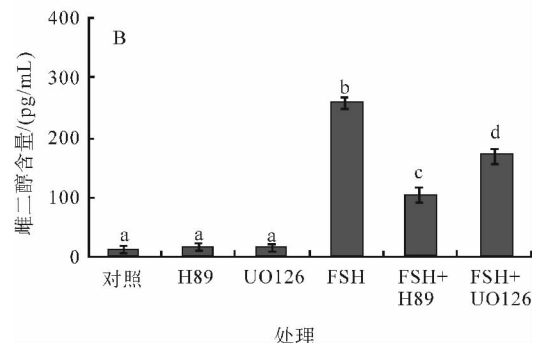
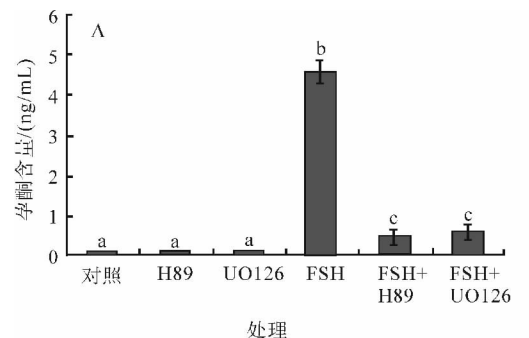


图 4 H89 和 UO126 对 FSH 诱导甾体生成的影响

2.4 UO126 对 FSH 诱导 StAR 表达的影响

鉴于 StAR 是甾体生成的限速蛋白质,本试验进一步检测了 FSH 活化的 ERK1/2 通路对 StAR 表达的调控作用。结果表明,与对照组相比,FSH 明显促进了 StAR 的表达;用 UO126 阻断 ERK1/2 通路,则明显抑制了 FSH 对 StAR 的诱导作用 ($P < 0.05$) (图 5)。激光共聚焦试验结果进一步支持了上述结论,即 FSH 显著提高了线粒体中 StAR 的荧光强度,而抑制 ERK1/2 活性,则明显降低了 StAR 信号(图 6)。

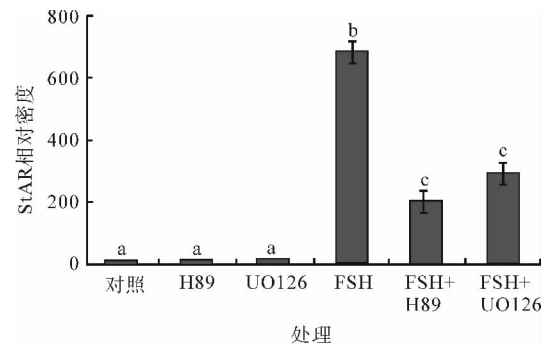
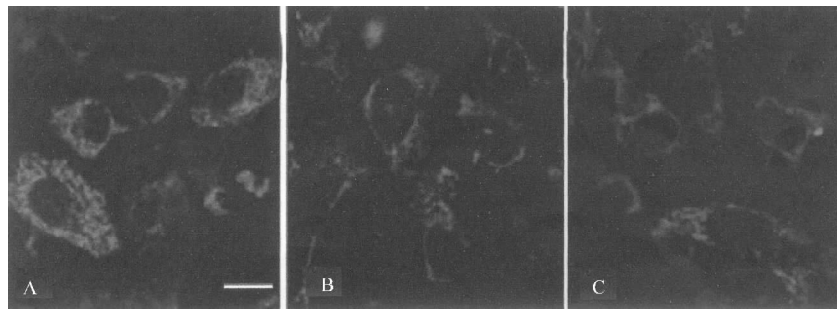


图 5 H89 和 UO126 对 FSH 诱导 StAR 表达的影响



A. FSH; B. FSH+H89; C. FSH+UO126

图 6 FSH 和各种抑制剂对 StAR 亚细胞定位和含量的影响

3 讨论

本研究以离体培养的 GC 为模型,证实 FSH 以时间依赖方式快速激活了 ERK1/2,当 FSH 作用 0.33 h 时,其磷酸化水平达到最高。这种激活方式与 Salvador 等^[13]的研究结果一致,但不同于 Moore 等^[5]的报道。

PCNA 是一种分子量为 35 kD 的核蛋白,常常被作为细胞增殖的标志分子,其作为 DNA 聚合酶 δ 的组成部分,在真核生物 DNA 合成、复制及修复方面发挥着重要作用。以 PCNA 为 GC 增殖指标,检测 FSH 对 GC 增殖的影响,发现 FSH 以时间依赖方式促进 PCNA 蛋白的表达。体外研究表明,在卵泡 GC 中,PCNA 蛋白的表达量随着卵泡发育而增加,在闭锁卵泡和黄体细胞中表达量降低或不表达^[14]。但 EI-Hefnawy 等^[2]指出,FSH 或 forskolin 单独作用不能诱导 GC 表达 PCNA 蛋白,与本研究结果有所不同。这种差异可能是由于不同的培养条件所致,如本研究使用的 GC 来源于 DES 处理过的 23 日龄大鼠卵泡,而 EI-Hefnawy 等使用的 GC 来源于未经 DES 处理的大鼠卵泡;在整个试验中,本研究使用的是无血清的 McCoy's 5a 培养基,而 EI-Hefnawy 等先用含 10% 血清的 M199 培养基培养

过夜,再用无血清培养液处理细胞。

本研究结果表明,用 H89 抑制 PKA 的活性后,显著降低了 FSH 对 PCNA 的诱导作用,提示 FSH 激活的 PKA 促进了 GC 增殖。Baptist 等^[15]指出,FSH 以 cAMP 依赖方式诱导 PCNA 蛋白的表达,PCNA 蛋白表达刺激了甲状腺上皮细胞的增殖。对人和小鼠 PCNA 基因序列进行分析发现,它们的启动子中含有 cAMP 反应元件,因此激素或生长因子可通过 cAMP-PKA 通路调节 PCNA 蛋白的表达^[16-17]。本研究发现,FSH 激活的 ERK1/2 也参与了 PCNA 蛋白的表达调控,用 UO126 阻断 ERK1/2 通路后,FSH 对 PCNA 的诱导作用明显减弱。以上结果提示除 PKA 外,FSH 激活的 ERK1/2 通路也诱导了 GC 增殖。

已知甾体生成是 GC 分化的重要指标。StAR 是甾体生成的限速蛋白质,在胆固醇跨膜运输过程中发挥着重要作用。本研究证实,FSH 促进了 StAR 表达和甾类激素合成,显著提高了 PCNA 蛋白的表达水平。本研究进一步研究了 ERK1/2 通路在 GC 甾体生成过程中的作用,用 UO126 阻断 ERK1/2 通路后发现,FSH 对 StAR 和甾类激素的刺激作用明显减弱。激光共聚焦结果进一步显示,FSH 显著提高了线粒体中 StAR 的荧光强度,而抑制 ERK1/2 活性则

降低了StAR信号。以上结果显示,FSH激活的ERK1/2通路促进了StAR蛋白的表达和甾类激素的合成,进而诱导了GC的分化。

关于MAPK在甾体生成过程中的作用报道不一,但有共识的是MAPK参与了胞外信号对甾体生成的调节过程。本研究结果显示,FSH激活的ERK1/2促进了GC甾类激素的生成。Cameron等^[18]研究发现,ERK1/2通路介导了促黄体激素(LH)和FSH对GC甾体生成的诱导作用。Moore等^[5]指出,FSH激活的ERK1/2通路选择性地调控甾体的生成,用UO126抑制ERK1/2活性提高了FSH对StAR和孕酮生成的促进作用,同时降低了FSH对雌激素生成的诱导作用。在甾类激素合成过程中,各种研究报道不太一致,造成这种差异的原因,其一,可能是由于细胞中存在多条信号通路,不同信号通路发挥不同的生理功能;其二,可能是由于信号通路具有细胞特异性,同一信号通路在不同类型或不同分化阶段的细胞中发挥的作用不同。本研究结果表明,在原代培养的GC中,FSH激活的ERK1/2通路促进了PCNA蛋白的表达和甾类激素的合成,进而诱导了GC的增殖和分化。

参考文献:

- [1] Kumar T R, Wang Y, Lu N, *et al.* Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility[J]. *Nat Genet*, 1997, 15(2): 201-204.
- [2] El-Hefnawy T, Zeleznik A J. Synergism between FSH and activin in the regulation of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and cyclin D₂ expression in rat granulosa cells[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(10): 4357-4362.
- [3] Jone P B, Hseueh A J. Regulation of ovarian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity by gonadotropin-releasing hormone and follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells[J]. *Endocrinology*, 1992, 110(5): 1663-1671.
- [4] Richards J S. Hormonal control of gene expression in the ovary[J]. *Endocr Rev*, 1994, 15(6): 725-751.
- [5] Moore R K, Fumio O, Shunichi S, *et al.* Role of ERK 1/2 in the differential synthesis of progesterone and estradiol by granulosa cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(4): 796-800.
- [6] Marshall C J. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase[J]. *Curr Opin Gene*, 1994, 4(1): 82-89.
- [7] Kyriakis J M, Avruch J. Sounding the alarm: Protein kinase cascades activated by stress and inflammation[J]. *Biology Chemistry*, 1996, 271(40): 24313-24316.
- [8] Denhardt D T. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: The potential for multiplex signaling[J]. *Biology Chemistry*, 1996, 318(3): 729-747.
- [9] Stocco D M. Intramitochondrial cholesterol transfer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1486(1): 184-197.
- [10] Jaskulski D, DeRiel J K, Mercer W E, *et al.* Inhibition of cell proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin[J]. *Science*, 1988, 240: 1544-1546.
- [11] Hall R A, Levison D A. Review assessment of cell proliferation in histological materia[J]. *Clin Pathol*, 1990, 43(3): 184-192.
- [12] Oktay K, Schenken R S, Nelson J F, *et al.* Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat[J]. *Biology Reprod*, 1995, 53(2): 295-301.
- [13] Salvador L M, Maizels E, Hales D B, *et al.* Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(8): 2986-2994.
- [14] Hall R A, Levison D A. Review: Assessment of cell proliferation in histological material[J]. *Clin Pathol*, 1990, 43(3): 184-192.
- [15] Baptist M, Dumont J E, Roger R R, *et al.* Demonstration of cell cycle kinetics in thyroid primary culture by immunostaining of proliferating cell nuclear antigen: Differences in cyclic AMP-dependent and independent mitogenic stimulation[J]. *Cell Science*, 1993, 105(1): 69-80.
- [16] Gyles S L, Burns C J, Whitehouse B J, *et al.* ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory protein(STAR) gene[J]. *Biology Chemistry*, 2001, 276(37): 34888-34895.
- [17] Seger R, Hanoch T, Rosenberg R, *et al.* The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis[J]. *Biology Chemistry*, 2001, 276(17): 13957-13964.
- [18] Cameron M R, Foster J S, Bukovsky A, *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinases by gonadotropins and cyclic adenosine 5'-monophosphates in porcine granulosa cells[J]. *Biology Reprod*, 1996, 55(1): 111-119.