

# 卵泡刺激素对人卵巢颗粒KGN细胞 TGF- $\beta$ 信号传导的影响



张铭露<sup>1,2</sup>, 温苗<sup>1,3</sup>, 杨泽岸<sup>1</sup>, 于思思<sup>1,4</sup>, 张媛<sup>1</sup>, 吴彦霖<sup>1</sup>

1. 中国食品药品检定研究院 (北京 102629)
2. 河南省药品医疗器械检验院 (郑州 450018)
3. 中国药科大学药学院 (南京 210009)
4. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院 (沈阳 117004)

**【摘要】目的** 利用抗体芯片技术考察卵泡刺激素 (FSH) 在不同时间上对卵巢颗粒细胞 (KGN) 转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 信号通路的影响。**方法** FSH 分别刺激 KGN 细胞 3、6、12、24、48、72 h 后收集细胞, 进行不同时间点的蛋白磷酸化水平差异含量考察, 对蛋白磷酸化水平差异进行 GO 功能注释和 KEGG 信号通路富集分析。**结果** FSH 可以介导 TGF- $\beta$  通路的传导, 促进颗粒细胞的 DNA 合成。FSH 作用 KGN 细胞 3、12 h 后, TGF- $\beta$  通路下游因子 Smad 蛋白磷酸化水平升高; GO 富集分析发现, 磷酸化 Smad 参与如复合物组装、信号转导等功能。作用 24 h 和 48 h 时对丝裂原活化蛋白激酶通路正向调节, 其下游因子环 AMP 依赖性转录因子 2、c-Jun、c-Fos 等蛋白磷酸化程度增加, 表明除了与 Smad 依赖型 TGF- $\beta$  通路有关, 也上调了非 Smad 依赖型 TGF- $\beta$  通路。12 h 后可观察到抑制性 I-Smad 功能富集, 说明其开始对 TGF- $\beta$  通路进行负调控, 与 R-Smad 竞争性结合, 阻断 TGF- $\beta$  信号传导; 随着 FSH 作用的时间增加, 对 TGF- $\beta$  信号通路的影响也逐渐变小。**结论** FSH 可以介导 KGN 细胞内 TGF- $\beta$  信号通路的传导, 促进后续的一系列反应。

**【关键词】** 卵泡刺激素; 转化生长因子  $\beta$  信号通路; 人卵巢颗粒细胞; 基因芯片; 丝裂原活化蛋白激酶通路; GO 功能注释; KEGG 信号通路富集分析; Smad 蛋白

**【中图分类号】** R711 **【文献标识码】** A

## Effects of follicle stimulating hormone on TGF- $\beta$ signal transduction in human ovarian granulosa KGN cells

ZHANG Minglu<sup>1,2</sup>, WEN Miao<sup>1,3</sup>, YANG Zean<sup>1</sup>, YU Sisi<sup>1,4</sup>, ZHANG Yuan<sup>1</sup>, WU Yanlin<sup>1</sup>

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China
2. Henan Institute of Drug and Medical Device Inspection, Zhengzhou 450018, China
3. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China
4. School of Life Sciences and Biopharmaceutical, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 117004, China

Corresponding author: WU Yanlin, Email: wyljoe@126.com

**【Abstract】Objective** Using protein chip technology to investigate the effects of follicle stimulating hormone (FSH) on the transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling pathway of

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202405114

通信作者: 吴彦霖, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, Email: wyljoe@126.com

<https://yxqy.whuzhmedj.com>

ovarian granulosa cells (KGN) at different times. **Methods** After FSH stimulation of KGN cells for 3, 6, 12, 24, 48, and 72 hours, the cells were collected and the differences in protein phosphorylation levels at different time points were investigated. GO functional annotation and KEGG signaling pathway enrichment analysis were performed on the differences in protein phosphorylation levels. **Results** FSH can mediate the conduction of TGF- $\beta$  pathway and promote DNA synthesis in granulosa cells. After 3 and 12 hours of FSH action on KGN cells, the phosphorylation level of downstream factor Smad protein in the TGF- $\beta$  pathway increased. GO enrichment analysis revealed that phosphorylated Smad is involved in functions such as complex assembly and signal transduction. At 24 and 48 hours of action, the mitogen-activated protein kinase pathway was positively regulated, and downstream factors such as cAMP-dependent transcription factor 2, c-Jun, and c-Fos showed an increased degree of phosphorylation, indicating that in addition to being related to the Smad dependent TGF- $\beta$  pathway, the non Smad dependent TGF- $\beta$  pathway was also upregulated. After 12 hours, the enrichment of inhibitory I-Smad function was observed, indicating that it began to negatively regulate the TGF- $\beta$  pathway, competitively bind with R-Smad, and block TGF- $\beta$  signaling. As the duration of FSH action increases, the impact on the TGF- $\beta$  signaling pathway gradually decreases. **Conclusion** FSH can mediate the transmission of TGF- $\beta$  signaling pathway in KGN cells, promoting subsequent series of reactions.

**【Keywords】** Follicle stimulating hormone; Transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway; Human ovarian granulosa cells; Gene chip; Mitogen-activated protein kinases pathway; GO functional annotation; KEGG signaling pathway enrichment analysis; Smad protein

哺乳动物的卵巢由最小单位卵泡组成，卵泡由卵母细胞、颗粒细胞和卵泡膜细胞三部分组成<sup>[1]</sup>。卵泡的数量和发育状态决定了卵巢生育功能的潜力。卵母细胞和颗粒细胞之间通过细胞间通讯共同调控了卵泡的生长发育<sup>[2]</sup>。然而只有少数的卵泡能达到成熟并最终排卵，99%以上的卵泡都会经历退化和闭锁，严重的卵泡闭锁会导致腔前卵泡退化、卵泡早衰、多囊卵巢综合征，卵泡刺激素和转化生长因子 $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 超家族在卵泡生长发育过程中有重要的调控作用<sup>[3]</sup>。

卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 是由脑垂体分泌的一种蛋白激素，通过促进颗粒细胞增殖和抑制卵泡闭锁的作用，调控卵泡的生长发育<sup>[4-6]</sup>。研究发现，FSH刺激青春期的母猪可减少卵泡闭锁的发生，表明其对卵泡存活和健康卵泡的发育有着积极的影响<sup>[7]</sup>。FSH可以抑制体外培养的颗粒细胞的凋亡，并在体内保护卵泡免受闭锁<sup>[8]</sup>。

TGF- $\beta$ 超家族由一类结构和功能相似的多肽生长因子亚家族组成，包括TGF- $\beta$ 、激活素、抑制素、骨形态发生蛋白、生长分化因子等<sup>[9-10]</sup>。

TGF- $\beta$ 信号通路作为人体最重要的信号通路之一，无论是Smad蛋白依赖型信号通路还是非Smad蛋白依赖型信号通路[包括细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、STE20/SPS1相关的脯氨酸/富含丙氨酸的激酶/c-Jun氨基末端激酶 (STE20/SPS1-related proline-alanine-rich kinase/Jun N-terminal kinase pathway, SPAK/JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 等通路]均对卵泡的生长发育有着重要影响。Smad蛋白是TGF- $\beta$ 家族受体下游的信号转导分子，可分为3类：受体激活型R-Smad (-1, -2, -3, -5, -8)、共同伴侣Co-Smad (-4)和抑制性I-Smad (-6, -7)，对于R-Smad的信号传导简单总结为TGF- $\beta$ 与膜上相应的II型受体和I型受体形成复合物，诱导II型受体磷酸化I型受体并激活其激酶活性，然后I型受体招募并活化下游的Smad蛋白，从而诱导Smad蛋白在细胞核内聚集并作为转录因子发挥转录调控作用<sup>[11]</sup>。袁丽娟<sup>[12]</sup>的研究验证了Smads作为TGF- $\beta$ 因子的下游因子，两者的表达水平同步变化。

TGF- $\beta$  信号通路对主要通过抑制卵泡闭锁和维持卵泡的正常状态和功能来影响生殖发育, 研究发现, 该信号通路中的重要细胞因子 TGF- $\beta$ 1 在生殖系统中高表达, 当 TGF- $\beta$ 1 的基因敲除后会导致小鼠发情周期异常, 卵母细胞发育不全, 胚胎早期骤停, 严重不孕; 体外实验发现, TGF- $\beta$ 1 的加入可以提高颗粒细胞的活力, 抑制细胞凋亡<sup>[3]</sup>。

卵泡刺激素和 TGF- $\beta$  超家族之间相互影响<sup>[8]</sup>。TGF- $\beta$  家族信号通路在 FSH 处理的颗粒细胞中的作用被广泛研究, FSH 可以影响 TGF- $\beta$  家族及其受体的表达和功能, FSH 可以通过 TGF- $\beta$  介导刺激 Smad2/Smad3 在颗粒细胞中表达, 进而调控卵泡的生长发育<sup>[13]</sup>。王雨桐等<sup>[14]</sup>在探讨 FSH 和 TGF- $\beta$  信号通路时发现, FSH 促进颗粒细胞增殖, 抑制其凋亡的作用在一定程度上依赖于 TGF- $\beta$  通路, FSH 和 TGF- $\beta$  信号通路在卵泡发育过程中相互协同。在 FSH 的存在下, TGF- $\beta$  可促进颗粒细胞增殖并使黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 受体表达增多, 雌激素分泌增多, 卵泡液生成增多<sup>[15-16]</sup>。此外, 研究发现, Smad2 缺陷的小鼠则具有胚胎致死性<sup>[17]</sup>; Smad3 缺乏的颗粒细胞会降低对促性腺激素的反应能力, 最终影响生育能力<sup>[18]</sup>; Smad4 敲低则会显著下调卵泡刺激素受体蛋白水平<sup>[19]</sup>。广泛的研究证明, Smad 作为 TGF- $\beta$  家族信号通路的下游因子, 是生育能力的重要调节剂。

抗体芯片技术可以实现同时对多个蛋白进行检测, 比传统的酶联免疫吸附分析或免疫印迹技术更快速、灵敏和经济, 本实验利用抗体芯片技术对 TGF- $\beta$  信号通路中的 8 个信号因子采用蛋白聚类分析, 筛选出具有磷酸化水平具有差异的蛋白, 并对差异表达因子进行 GO 功能注释和 KEGG 信号通路富集, 探究 FSH 的作用时间对人卵巢颗粒细胞的 TGF- $\beta$  信号通路的影响, 为后续卵巢相关疾病的治疗提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

1389 A2 生物安全柜 (Thermo); 3141 二氧化碳培养箱 (Thermo); 6R 高速离心机 (Beckman Coulter); Z2 细胞计数仪 (Beckman Coulter); SYNERGY HT 多功能微板检测仪酶标仪 (Biotek);

抗体芯片检测系统 (RayBiotech Inc.)。

### 1.2 主要药品及试剂

DMEM/F12 培养基 (批号: 11330-032)、胎牛血清 (批号: 10099-141C)、0.25% Trypsin-EDTA (批号: 25200-056)、PBS 缓冲液 [pH 7.4 (1 $\times$ ), 批号: 2081843] 购于 Gibco; 5<sup>th</sup>-人绝经尿促性腺素 (FSH 220 IU/支, LH 203 IU/支, 批号: 150524-201805)、人 TGF- $\beta$  信号通路磷酸化抗体芯片 1 (AAH-TGFB-1 芯片, 批号: 1113208018) 购于 RayBiotech Inc; RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购于碧云天生物技术有限公司。

### 1.3 细胞株

人卵巢颗粒细胞系 (ovarian granulosa cells, KGN): 解放军总医院母义明教授赠送, 中国食品药品检定研究院药理室建库保存。

## 2 方法与结果

### 2.1 给药及分组

实验组: 当药物作用时间点到达 3、6、12、24、48、72 h 时, 每个时间点确保细胞数量约为  $10^6 \sim 10^8$  个, 将上清吸掉, 用 PBS (4 $^{\circ}$ C) 清洗 2 次细胞, 将细胞从培养板刮下, 500~1 000  $\times$  g (4 $^{\circ}$ C) 离心 10 min, 弃上清, 保留细胞沉淀, 每个样品的总蛋白量不少于 350  $\mu$ g。空白组: 确定无药物作用的细胞数量约为  $10^6 \sim 10^8$  个, 将上清吸掉, 用 PBS (4 $^{\circ}$ C) 清洗 2 次细胞, 将细胞从培养板刮下, 500~1 000  $\times$  g (4 $^{\circ}$ C) 离心 10 min, 弃上清, 保留细胞沉淀, 总蛋白量不少于 350  $\mu$ g。

### 2.2 3 h 组

#### 2.2.1 磷酸化水平变化蛋白筛选

将 3 h 组与空白组对比, 筛选磷酸化水平变化蛋白, 筛选以表达差异倍数 (fold Change, FC) = < 0.83 或者 FC > = 1.2 (|logFC| > 0.263) 为标准, 散点图结果如图 1A, 本研究发现, 与空白组相比, 3 h 实验组的 KGN 有 4 个蛋白磷酸化程度升高, 分别是 Smad5、Smad2、Smad4 和 c-Jun。

#### 2.2.2 GO 富集分析

将空白组和 3 h 组筛选出的磷酸化水平变化蛋白进行 GO 富集分析发现, 涉及 8 种生物过程 (biological processes, BP), 其中主要有跨膜受体蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路、TGF 信号通路、Smad 蛋白信号转导、Smad 蛋白复合物组装、

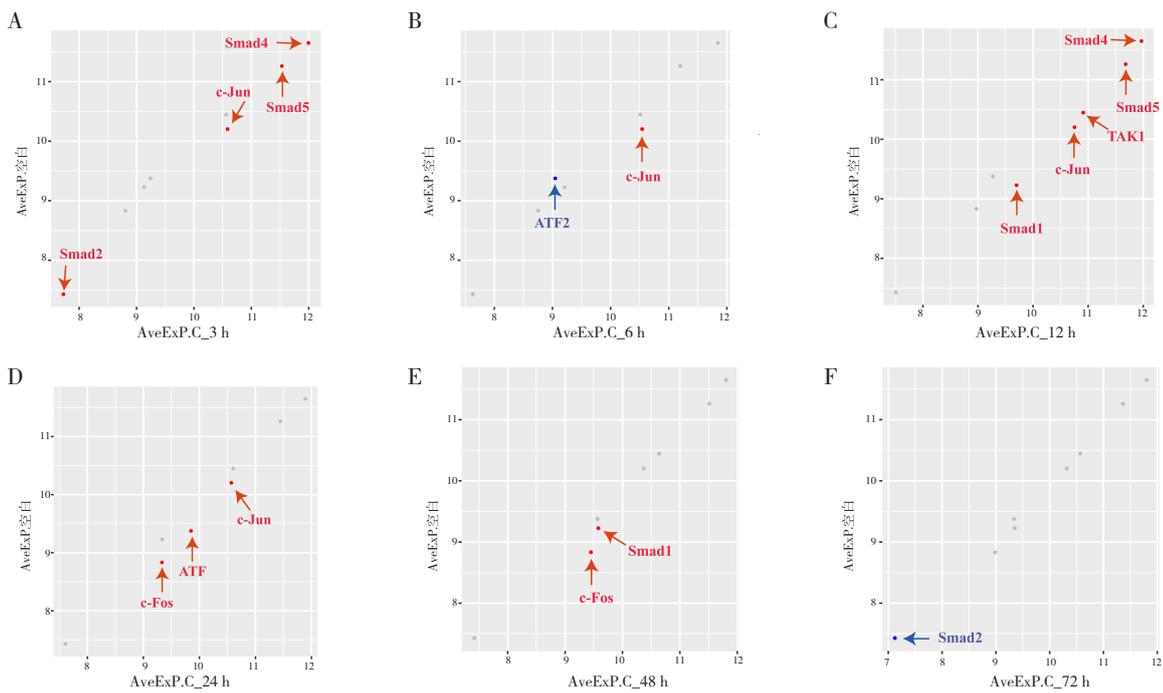


图1 各组别磷酸化水平变化蛋白散点图

Figure 1. Scatter plot of protein changes in phosphorylation levels by groups

注：A-F分别为3、6、12、48、72 h组；红色表示上调蛋白，蓝色表示下调蛋白，灰色表示差异不明显。

对TGF的反应等(图2A)；3种细胞组分(cellular components, CC)，主要有RNA聚合酶II转录调控复合物等(图2B)；8种分子功能(molecular function, MF)，主要有泛素蛋白连接酶结合、泛素样蛋白连接酶结合、Smad结合、R-Smad结合、I-Smad结合、DNA结合转录因子活性、RNA聚合酶II特异性等(图2C)。

### 2.2.3 KEGG富集分析

磷酸化水平变化蛋白KEGG显著富集的前12条通路见图3A，其中富集的高通路主要有Th17细胞分化、TGF-β信号通路、调节干细胞多能性的信号通路、人类T细胞白血病病毒感染、结肠直肠癌等通路。其中，TGF-β信号通路对动物繁殖及卵巢发育有着重要的调节作用。

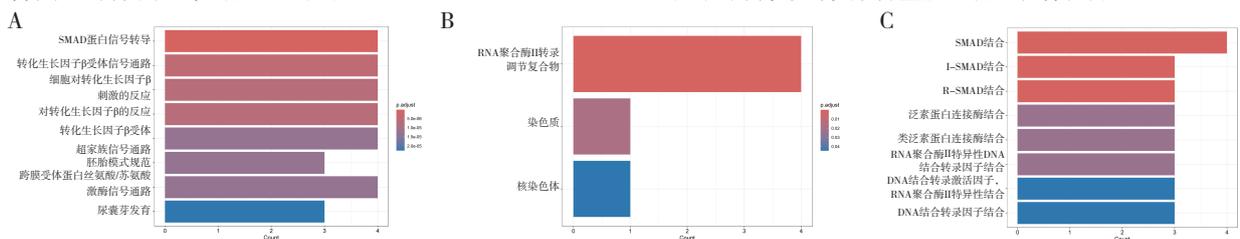


图2 3 h组差异表达基因GO富集分析

Figure 2. GO enrichment analysis of differentially expressed genes in 3 h group

注：A-C分别为BP、CC、MF分析。

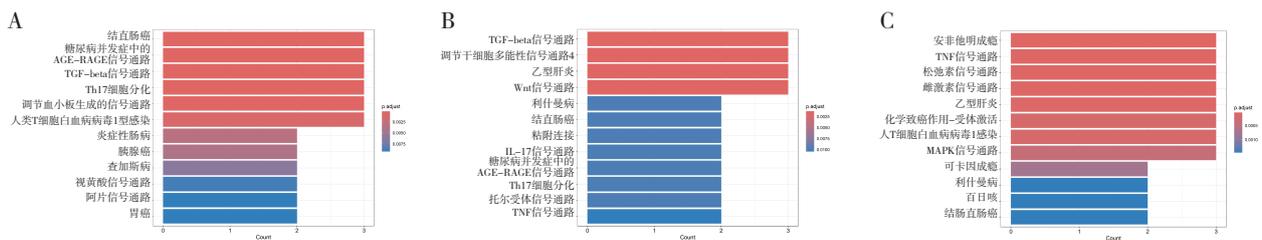


图3 各组别差异表达基因通路富集分析

Figure 3. Enrichment analysis of differentially expressed gene pathways by groups

注：A-C分别为3、12、24 h组。

### 2.3 6 h组磷酸化水平变化蛋白筛选

筛选条件同“2.2.1”项，结果散点图如图1B所示，1个磷酸化程度升高蛋白c-Jun和1个磷酸化程度降低蛋白环AMP依赖性转录因子2（cAMP-dependent transcription factor 2, ATF2）。

### 2.4 12 h组

#### 2.4.1 磷酸化水平变化蛋白筛选

筛选条件同“2.2.1”项，结果散点图如图1C所示，显示5个磷酸化程度升高蛋白，分别为Smad1、Smad4、Smad5、TGF 激酶1（TGF activated kinase 1, TAK1）、c-Jun。

#### 2.4.2 GO富集分析

将空白组和12 h组筛选出来的磷酸化水平变化蛋白进行GO富集分析发现，涉及8种BP，其中主要有跨膜受体蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路、TGF信号通路、Smad蛋白信号转导、对TGF的反应等（图4A）；8种CC，主要有RNA聚合酶II转录调控复合物等（图4B）；8种MF，主要有泛素蛋白连接酶结合、泛素样蛋白连接酶结合、Smad结合、R-Smad结合、I-Smad结合、DNA结合转录激活因子活性等（图4C）。

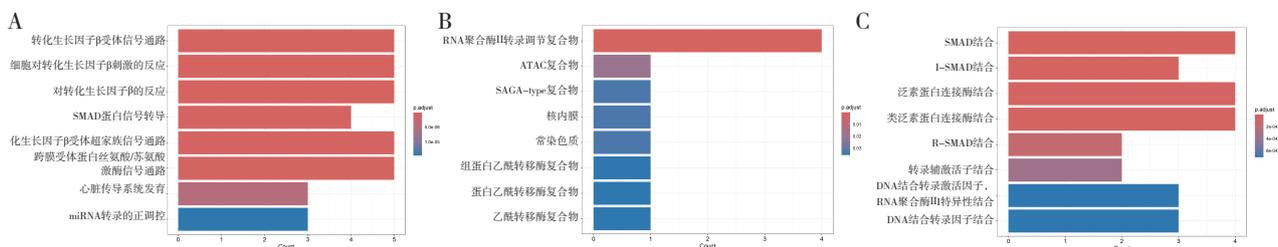


图4 12 h组差异表达基因GO富集分析

Figure 4. GO enrichment analysis of differentially expressed genes in 12 h-group

注：A~C分别为BP、CC、MF分析。

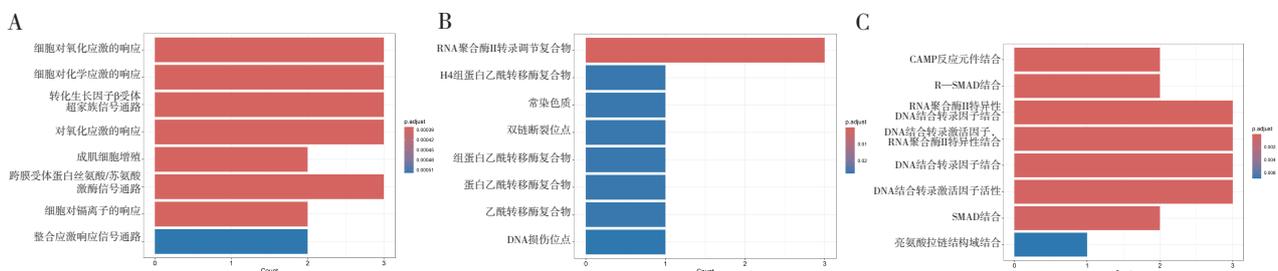


图5 24 h组差异表达基因GO富集分析

Figure 5. GO enrichment analysis of differentially expressed genes in 24 h-group

注：A~C分别为BP、CC、MF分析。

### 2.5.3 KEGG富集分析

磷酸化水平变化蛋白KEGG显著富集的前12种通路如图3C，其中高富集通路有肿瘤

### 2.4.3 KEGG富集分析

磷酸化水平变化蛋白KEGG显著富集的前12种通路见图3B，其中富集的高通路有Wnt信号通路、TGF-β信号通路、调节干细胞多能性的信号通路、乙型肝炎。

### 2.5 24 h组

#### 2.5.1 磷酸化水平变化蛋白筛选

筛选条件同“2.2.1”项，结果散点图如图1D所示，显示有3个磷酸化程度升高的蛋白，分别是c-Jun、ATF2、c-Fos。

#### 2.5.2 GO富集分析

将空白组和24 h组筛选出的磷酸化水平变化蛋白进行GO富集分析可知，涉及8种BP，主要有跨膜受体蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路、TGF信号通路等（图5A）；8种CC，主要有RNA聚合酶II转录调控复合物等（图5B）；8种MF，主要有Smad结合、RNA聚合酶II激活转录因子结合、RNA聚合酶II特异性DNA结合转录因子结合、DNA结合转录因子结合、DNA结合转录因子活性、RNA聚合酶II特异性、DNA结合转录激活因子活性、激活转录因子结合等（图5C）。

坏死因子信号通路、松弛素信号通路、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路、人类T细胞白血病病毒感染、

乙型肝炎、雌激素信号通路。

## 2.6 48 h磷酸化水平变化蛋白筛选

筛选条件同“2.2.1”项，结果散点图如图 1E 所示，显示有 2 个磷酸化程度升高蛋白，分别是 Smad1、c-Fos。

## 2.7 72 h组磷酸化水平变化蛋白筛选

筛选条件同“2.2.1”项，结果散点图如图 1F 所示，显示有 1 个磷酸化程度降低蛋白 Smad2。

## 3 讨论

由结果可发现在 FSH 作用 KGN 3、12 h 后，TGF- $\beta$  信号通路表达更加显著，其下游因子 Smad 蛋白磷酸化水平升高。GO 富集分析发现，Smad 蛋白相关的功能如复合物组装、信号转导等基因富集增、表达增加，可以得到在调节卵巢颗粒细胞上还部分依赖 TGF- $\beta$  信号通路的结论；在作用 24、48 h 时对其他通路如 MAPK 通路产生更加积极的影响，其下游因子 ATF2、c-Jun、c-Fos 等蛋白表达增加，结果表明除了与 Smad 依赖型 TGF- $\beta$  信号通路有关，对于非 Smad 依赖型 TGF- $\beta$  信号通路也产生了积极的影响，同样也在介导卵巢颗粒细胞的生长发育。对于 TGF- $\beta$  通路的表达富集增加的结果，可以看到在 12 h 之后，DNA 转录翻译等功能富集增加，表明 FSH 介导的 TGF- $\beta$  信号通路可增加颗粒细胞的 DNA 合成；与此同时，在 12 h 之后可以观察到抑制性 I-Smad 功能的富集，说明其开始对 TGF- $\beta$  通路进行负调控，与 R-Smad 竞争性结合，阻断 TGF- $\beta$  信号传导。随着 FSH 作用的时间增加，对 TGF- $\beta$  信号通路的影响也逐渐变小。

TGF- $\beta$  超家族对卵巢功能的调节有着重要的作用，TGF- $\beta$ 1 在多种卵巢细胞中高表达，并作为卵泡内调节因子以旁分泌或自分泌的方式调节细胞的增殖分化<sup>[20]</sup>、激素分泌<sup>[21]</sup>、卵泡血管生成<sup>[21]</sup>、卵泡颗粒细胞黄体化<sup>[22]</sup>。有研究还发现，TGF- $\beta$ 1 可以通过介导 Smad4/ 促凋亡基因 Bcl-2 修饰因子 (the pro-apoptotic gene Bcl-2-modifying factor, BMF) 抑制颗粒细胞的凋亡，促进增殖；用激活素处理大鼠后，卵巢卵泡闭锁的比例下降<sup>[23-24]</sup>。TGF 和 FSH 目前在临床上可以用来治疗不孕不育等生殖方面疾病<sup>[25-27]</sup>。TGF- $\beta$  超家族分子 TGF- $\beta$ 、激活素等目前已用作多囊卵巢综合征等生殖疾病的诊断和预后指标之一，探究 FSH 与

TGF- $\beta$  信号通路之间的关系对于治疗临床上使用 FSH 后效果较差甚至抵抗的患者有重要意义<sup>[14]</sup>。TGF- $\beta$ -Smad 通路对肿瘤的发生和发展有影响，其中对颗粒细胞瘤也有重要影响。有研究发现，该通路可促进双胰蛋白酶，金属蛋白酶 9 和肌肉萎缩盒蛋白 32 等抑癌基因转录，使肿瘤相关基因沉默。但持续高水平的 TGF- $\beta$ 1 又会使上皮细胞中的细胞骨架蛋白和基质金属蛋白酶分泌增多，促进肿瘤细胞增殖和转移<sup>[28]</sup>。Smad1/5 敲除小鼠的颗粒细胞瘤发生率明显增高，而上调骨形态发生蛋白受体表达水平可抑制颗粒细胞瘤的生长<sup>[15]</sup>。更深入地探索 FSH 与 TGF- $\beta$  信号通路在生殖调节过程中的交互作用，将有助于辅助诊断和治疗相关生殖性疾病提供新的思路与方法，同时可帮助辅助生殖方面如靶向治疗不孕不育寻找更加安全有效的治疗手段。

本研究关注了 FSH 对 TGF- $\beta$  信号通路的影响，证明 TGF- $\beta$  信号通路在生殖生育方面有重要影响，但仍有一些问题有待解决和思考。在不同时间点不同的 Smad 蛋白磷酸化水平差异表明，即使在同一个信号通路下，调节机制可能有所不同。有报道高度相关的 Smad2 和 Smad3 具有不同的配体激活反应，Smad3 增强了激活素介导的 FSH 的亚基启动子的刺激，而 Smad2 则使 FSH 的亚基启动子失活<sup>[29]</sup>。Hamil 等<sup>[30]</sup>发现 c-Jun 等在哺乳动物生殖系统中 FSH 信号传递中期起重要作用，Liu 等<sup>[9]</sup>发现 c-Jun、c-Fos 等是作为 Smad4 的共激活因子调节信号，一方面证明 Smad4 调节靶基因的机制与 Smad2/3 不同，另一方面引发思考本研究中差异蛋白 c-Jun、c-Fos 等与 Smads 之间的相互关系，两种 TGF- $\beta$  信号通路之间是如何交叉作用还有待后续研究。

## 参考文献

- 1 吴彦霖, 张铭露, 张媛, 等. 基于人卵巢颗粒细胞 KGN 建立的卵泡刺激素体外生物活性效价测定法 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(14): 1316-1322. [Wu YL, Zhang ML, Zhang Y, et al A method for determining the in vitro bioactivity and potency of follicle stimulating hormone based on human ovarian granulosa cell KGN[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2021, 30(14): 1316-1322.] DOI: 10.3969/j.issn.1003-3734.2021.14.011.
- 2 阮鑫, 董晓英. 卵泡发育过程中的细胞间通讯 [J]. 医

- 学研究杂志, 2022, 51(6): 177–180. [Ruan X, Dong XY. Intercellular communication during follicular development[J]. Journal of Medical Research, 2022, 51(6): 177–180.] DOI: [10.11969/j.issn.1673-548X.2022.06.037](https://doi.org/10.11969/j.issn.1673-548X.2022.06.037).
- 3 Li Q, Huo Y, Wang S, et al. TGF- $\beta$ 1 regulates the lncRNA transcriptome of ovarian granulosa cells in a transcription activity-dependent manner[J]. Cell Prolif, 2023, 56(1): e13336. DOI: [10.1111/cpr.13336](https://doi.org/10.1111/cpr.13336).
  - 4 李清春, 李梦寻, 徐梦思, 等. TGF $\beta$ RI、TGF $\beta$ RII、FSH 和 TGF $\beta$ 1 对猪颗粒细胞增殖凋亡的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(3): 196–203. [Li QC, Li MX, Xu MS, et al. The effect of TGF R1, TGF R2, FSH, and TGF $\beta$ 1 on the proliferation and apoptosis of pig granulosa cells[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry, 2023, 59(3): 196–203.] DOI: [10.19556/j.0258-7033.20220301-04](https://doi.org/10.19556/j.0258-7033.20220301-04).
  - 5 McDonald R, Sadler C, Kumar TR. Gain-of-function genetic models to study fsh action[J]. Front Endocrinol, 2019, 10: 28. DOI: [10.3389/fendo.2019.00028](https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00028).
  - 6 Wang HQ, Zhang WD, Yuan B, et al. Advances in the regulation of mammalian follicle-stimulating hormone secretion[J]. Animals, 2021, 11(4): 1134. DOI: [10.3390/ani11041134](https://doi.org/10.3390/ani11041134).
  - 7 Alfradique VAP, Netto DLS, Alves SVP, et al. The impact of FSH stimulation and age on the ovarian and uterine traits and histomorphometry of prepubertal gilts[J]. Domest Anim Endocrinol, 2023, 83: 106786. DOI: [10.1016/j.domaniend.2023.106786](https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2023.106786).
  - 8 Chu YL, Xu YR, Yang WX, et al. The role of FSH and TGF- $\beta$  superfamily in follicle atresia[J]. Aging, 2018, 10(3): 305–321. DOI: [10.18632/aging.101391](https://doi.org/10.18632/aging.101391).
  - 9 Liu L, Li Q, Yang L, et al. SMAD4 feedback activates the canonical TGF- $\beta$  family signaling pathways[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 10024. DOI: [10.3390/ijms221810024](https://doi.org/10.3390/ijms221810024).
  - 10 Antebi YE, Linton JM, Klumpe H, et al. Combinatorial signal perception in the BMP pathway[J]. Cell, 2017, 170(6): 1184–1196. e24. DOI: [10.1016/j.cell.2017.08.015](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.015).
  - 11 徐梦思. TGF  $\beta$ -SMAD 信号通路对猪颗粒细胞和繁殖性状的作用研究[D]. 新疆石河子: 石河子大学, 2016. DOI: [10.7666/d.D718150](https://doi.org/10.7666/d.D718150).
  - 12 袁丽娟. TGF- $\beta$  和 Smad4 在绝经过渡期大鼠卵巢及其颗粒细胞中的表达变化[D]. 河北张家口: 河北北方学院, 2017. DOI: [10.7666/d.Y3301761](https://doi.org/10.7666/d.Y3301761).
  - 13 卫晓红, 祁丽花, 徐健, 等. 卵泡刺激素调节大鼠卵巢颗粒细胞中 Smad2/Smad3 蛋白的表达及磷酸化[J]. 解剖学杂志, 2008, 31(2): 141–144. [Wei XH, Qi LH, Xu J, et al. Follicle stimulating hormone regulates the expression and phosphorylation of Smad2/Smad3 protein in rat ovarian granulosa cells[J]. Journal of Anatomy, 2008, 31(2): 141–144.] DOI: [10.3969/j.issn.1001-1633.2008.02.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1633.2008.02.001).
  - 14 王雨桐, 卫晓红, 葛玲, 等. 转化生长因子  $\beta$  信号通路对卵泡刺激素调节卵巢颗粒细胞功能的影响[J]. 解剖学报, 2021, 52(1): 118–123. [Wang YT, Wei XH, Ge L, et al. The effect of transforming growth factor  $\beta$  signaling pathways on the regulation of ovarian granulosa cell function by follicle stimulating hormone[J]. Journal of Anatomy, 2021, 52(1): 118–123.] DOI: [10.16098/j.issn.0529-1356.2021.01.019](https://doi.org/10.16098/j.issn.0529-1356.2021.01.019).
  - 15 习玥玥, 周素, 王世宣. 转化生长因子  $\beta$  超家族与卵巢疾病[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(12): 15–18, 2. [Xi YY, Zhou S, Wang SX. Transforming growth factor  $\beta$  superfamily and ovarian diseases[J]. Journal of Medical Research, 2017, 46 (12): 15–18, 2.] DOI: [10.11969/j.issn.1673-548X.2017.12.005](https://doi.org/10.11969/j.issn.1673-548X.2017.12.005).
  - 16 Liu Y, Chen X, Xue X, et al. Effects of Smad3 on the proliferation and steroidogenesis in human ovarian luteinized granulosa cells[J]. IUBMB Life, 2014, 66(6): 424–437. DOI: [10.1002/iub.1280](https://doi.org/10.1002/iub.1280).
  - 17 Pangas SA, Matzuk MM. Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development[J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 225(1–2): 83–91. DOI: [10.1016/j.mce.2004.02.017](https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.02.017).
  - 18 Gong X, McGee EA. Smad3 is required for normal follicular follicle-stimulating hormone responsiveness in the mouse I[J]. Biol Reprod, 2009, 81(4): 730–738. DOI: [10.1095/biolreprod.108.070086](https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070086).
  - 19 Shen H, Wang Y. Activation of TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway inhibits the development of ovarian follicle in polycystic ovary syndrome by promoting apoptosis of granulosa cells[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 11976–11985. DOI: [10.1002/jcp.27854](https://doi.org/10.1002/jcp.27854).
  - 20 Li Q, Du X, Wang L, et al. TGF- $\beta$ 1 controls porcine granulosa cell states: a miRNA-mRNA network view[J]. Theriogenology, 2021, 160: 50–60. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2020.11.001](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.001).
  - 21 Mattar D, Samir M, Laird M, et al. Modulatory effects of TGF- $\beta$ 1 and BMP6 on thecal angiogenesis and

- steroidogenesis in the bovine ovary[J]. *Reproduction*, 2020, 159(4): 397–408. DOI: [10.1530/REP-19-0311](https://doi.org/10.1530/REP-19-0311).
- 22 Li H, Chang H, Shi Z, et al. The p38 signaling pathway mediates the TGF- $\beta$ 1-induced increase in type I collagen deposition in human granulosa cells[J]. *FASEB J*, 2020, 34(11): 15591–15604. DOI: [10.1096/fj.202001377R](https://doi.org/10.1096/fj.202001377R).
- 23 Li M, Liang W, Luo Y, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 mediates the SMAD4/BMF pathway to regulate ovarian granulosa cell apoptosis in small tail Han sheep[J]. *Theriogenology*, 2024, 214: 360–369. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2023.11.009](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.11.009).
- 24 Chong Z, Dong P, Riaz H, et al. Disruption of follistatin by RNAi increases apoptosis, arrests S-phase of cell cycle and decreases estradiol production in bovine granulosa cells[J]. *Anim Reprod Sci*, 2015, 155: 80–88. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2015.02.003](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.02.003).
- 25 Simoni M, Brigante G, Rochira V, et al. Prospects for FSH treatment of male infertility[J]. *JCEM*, 2020, 105(7): 2105–2118. DOI: [10.1210/clinem/dgaa243](https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa243).
- 26 Casarini L, Crépieux P, Reiter E, et al. FSH for the treatment of male infertility[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2270. DOI: [10.3390/ijms21072270](https://doi.org/10.3390/ijms21072270).
- 27 Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Reproductive Endocrinology and Infertility. Use of exogenous gonadotropins for ovulation induction in anovulatory women: a committee opinion[J]. *Fertil Steril*, 2020, 113(1): 66–70. DOI: [10.1016/j.fertnstert.2019.09.020](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.09.020).
- 28 Kenny HA, Chiang CY, White EA, et al. Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(10): 4614–4628. DOI: [10.1172/JCI74778](https://doi.org/10.1172/JCI74778).
- 29 Bernard DJ. Both SMAD2 and SMAD3 mediate activin-stimulated expression of the follicle-stimulating hormone  $\beta$  subunit in mouse gonadotrope cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(3): 606–623. DOI: [10.1210/me.2003-0264](https://doi.org/10.1210/me.2003-0264).
- 30 Hamil KG, Conti M, Shimasaki S, et al. Follicle-stimulating hormone regulation of AP-1: inhibition of c-jun and stimulation of jun-B gene transcription in the rat Sertoli cell[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1994, 99(2): 269–277. DOI: [10.1016/0303-7207\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90017-5).

收稿日期: 2024年05月20日 修回日期: 2024年08月15日  
本文编辑: 李阳 钟巧妮