

丁 威,邢 军,周燕芬,等. 二花脸猪卵巢卵泡发育过程中可溶性鸟苷酸环化酶和一氧化氮合酶活性变化及其定位[J]. 江苏农业科学,2018, 46(19):181-186.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.049

二花脸猪卵巢卵泡发育过程中可溶性鸟苷酸环化酶和一氧化氮合酶活性变化及其定位

丁 威^{1,2},邢 军^{1,2},周燕芬³,刘 晨^{1,2},魏全伟²,石放雄²

(1. 江苏农林职业技术学院,江苏句容 212400; 2. 南京农业大学动物科技学院,江苏南京 210095; 3. 江苏省农业科学院,江苏南京 210014)

摘要:为研究在胎猪卵巢发育过程中,NO/sGC/cGMP 信号通路对猪卵泡发育的影响,选取 70 日龄、90 日龄胎猪和 1 日龄仔猪以及 120 日龄母猪为试验动物,取其卵巢,对其进行免疫组织化学分析,研究一氧化氮合酶[eNOS (endothelial nitric oxide synthase)、iNOS(inducible nitric oxide synthesis)、nNOS(neuronal nitric oxide synthase)]以及可溶性鸟苷酸环化酶(sGCα1、sGCβ1)在卵巢中的表达,并使用化学比色法进行酶活性测定。结果表明,3 种 NOS 在卵巢不同细胞中均有表达,特别是随着卵泡的发育,在膜细胞和颗粒细胞中的表达逐渐增强。而 sGCα1 和 sGCβ1 除了在卵巢的腔前卵泡的颗粒细胞中表达,也在黄体细胞和有腔卵泡膜细胞中有较高的表达量。研究发现,sGCα1 和 sGCβ1 在腔前卵泡的颗粒细胞中的表达量最高,且随着卵泡的不断发育,这 2 种蛋白的表达强度逐渐降低;总 NOS、eNOS、iNOS 活性在出生前期显著高于出生后期($P < 0.05$),nNOS 含量在出生前期和出生后期之间差异不显著($P > 0.05$)。说明 NO/sGC/cGMP 通路在卵泡的早期发育过程中发挥了重要的作用。

关键词:猪;卵巢;一氧化氮合酶;可溶性鸟苷酸环化酶;细胞

中图分类号: S828.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0181-06

哺乳动物的卵巢是其生殖系统中的重要功能器官,主要包含卵泡、黄体。随着卵泡的发育、闭锁,颗粒细胞合成雌激素(E_2)的功能发生明显改变,而排卵后形成的黄体及黄体退化,进一步形成了孕酮的周期性变化,在这个过程中卵巢周期性变化又受到下丘脑-垂体-性腺轴的精准调控。除此以外,卵泡的形成和发育又受到胰岛素样生长因子(IGF-1)、锌指转录因子 4(GATA4)、叉头转录因子 1(foxo1)等多种因

子的影响。研究表明,明星分子一氧化氮(NO)作为细胞间的信使,在卵泡发育及其生成类固醇激素等过程中发挥重要的调节作用^[1-3]。在动物体内,一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,简称 NOS)的主要功能是催化精氨酸分解生成 NO,同时生成 L-瓜氨酸。而 NOS 又是合成 NO 的限速酶,在调控 NO 合成过程中发挥关键作用。根据 NOS 对 Ca^{2+} 的依赖性可将其分为 2 种类型: Ca^{2+} 依赖型[nNOS(neuronal nitric oxide synthase)、eNOS(endothelial nitric oxide synthase)]和非 Ca^{2+} 依赖型[iNOS(inducible nitric oxide synthesis)],而从结构和功能上可将其分为 3 种构型:神经型(nNOS)、诱导型(iNOS)、内皮型(eNOS),其中 iNOS 主要在巨噬细胞、嗜中性白细胞、内皮细胞及上皮细胞中表达^[4-5];nNOS 主要在脑组织中表达,它是第 1 个被纯化和克隆的同工酶^[6-7];eNOS 基因在各种属之间进化保守,且主要在血管内皮细胞中检测到表达^[8]。Stuehr 等研究表明,多种细胞因子能够改变 iNOS 在体内的生物学活性^[9]。

收稿日期:2017-06-01

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK2011499、BK20171310);江苏省农业自主创新项目[编号:CX(12)2037];镇江市科技计划(编号:NY2012027);江苏农林职业技术学院基金扶持项目(编号:2016kj001);江苏高校“青蓝工程”中青年学术带头人资助项目(编号:苏教师[2017]15号)。

作者简介:丁 威(1979—),男,黑龙江巴彦人,博士,副教授,主要从事猪的卵巢卵泡发育调控机制研究。Tel:(0511)87276896; E-mail:qishi6598@126.com。

方猪遗传资源大多数是在特定的生态条件下形成的,其产品各具特色,并以其特有“风味”和地方“特色”日益被市场看好。因此,地方猪遗传资源的合理开发利用,生产优质猪肉产品,是实现畜牧业结构优化调整的重要举措,有利于进一步做大畜牧业的特色优势。

参考文献:

- [1] 国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志·猪志[M]. 北京:中国农业出版社,2011.
- [2] 严林俊,徐海燕. 江苏省地方猪种资源现状分析及保护利用[J].

- 家畜生态学报,2015,36(10):86-90.
- [3] 赵思思,贾 青,胡慧艳,等. 江海型猪品种资源状况变化分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):179-182.
- [4] 王 勇,朱满兴,侯庆永,等. 地方猪种保护利用现状及对策[J]. 畜牧与兽医,2012,44(3):88-90.
- [5] 郭源梅,李龙云,赖昭胜,等. 中国地方猪种利用现状与展望[J]. 江西农业大学学报,2017,39(3):427-435.
- [6] 王立贤,程笃学,赵克斌,等. 论我国地方猪种资源的利用[J]. 中国畜牧杂志,2007,43(19):50-54.
- [7] 郑雪君,杨婷婷. 中国地方猪品种的保护与利用分析[J]. 中国畜牧杂志,2015,51(16):25-27.

在小鼠、大鼠、猪等动物的生殖系统中,研究人员对 NOS 进行了大量的研究^[10-13]。Mitchell 等在小鼠的卵母细胞、颗粒细胞以及膜细胞中均检测到 iNOS、eNOS 的表达^[14]。笔者所在实验室前期研究表明,在卵母细胞中均检测到 NOS3 种亚型的表达,且随着卵泡的发育,NOS 的表达量逐渐增加^[15]。此外,也有相关研究报道,在卵巢的各类细胞中检测到 eNOS 表达^[16]。而仅在卵泡的颗粒细胞和黄体细胞中检测到 iNOS 的表达^[1,17-19]。nNOS 在神经系统和非神经系统等的细胞和组织中均有表达^[20-22]。在猪卵巢上已有一些关于 NOS 的研究,但先前的研究结果并不一致^[11,19,23-25]。目前,关于 NOS 在猪卵巢组织中的表达缺乏系统性的研究,而在早期卵巢形成和发育过程中,特别是关于胎儿期和出生期胎猪卵巢的 NOS 研究至今鲜有开展。

在细胞质中可溶性的鸟苷酸环化酶能够催化鸟苷三磷酸 (guanosine triphosphate, 简称 GTP) 转变为环鸟苷酸 (guanosine 3', 5' - cyclic phosphate, 简称 cGMP), 而生成的 cGMP 在卵巢生成类固醇激素、促性腺激素受体的表达、颗粒细胞凋亡、卵泡排卵等方面具有非常重要的作用^[26-30]。可溶性的鸟苷酸环化酶 (sGC) 含有 α 、 β 亚基, 其中 α 含有 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 异构结构, β 含有 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 异构结构^[31-32]。前期研究结果表明, sGC α 、sGC β 在大鼠卵巢腔前卵泡中的表达较强, 而在有腔卵泡中的表达强度减弱^[15,33]。由此可见, sGC 在卵巢卵泡形成和早期发育过程中起到一定的作用。然而, 关于 sGC 在猪卵巢卵泡形成及发育过程中的研究鲜有报道。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验动物为性成熟、体质量接近的母猪, 来自于南京农业大学试验猪场。试验动物依据二花脸饲养标准进行普通饲养, 在其发情周期起始的 24 h 后进行人工授精, 间隔 12 ~ 24 h 复配 1 ~ 2 次, 并将第 1 次配种日期记为怀孕 0 d。选择胎 70 日龄 (70 dpc)、胎 90 日龄 (90 dpc)、新生 1 日龄 (1 dpp) 和生后 120 日龄 (120 dpp) 等 4 个日龄阶段的母猪各 5 头, 其中前 3 个日龄阶段属于出生前期, 第 4 个日龄阶段属于出生后期。采集一侧卵巢置于 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, 简称 PFA) 中固定 36 ~ 48 h, 以备进行组织学分析; 采集另一侧卵巢置于液氮中保存, 用于酶活性测定。

1.2 试剂

3, 3 - 二甲基联苯胺 (3, 3' - diaminobenzidine tetrahydrochloride, 简称 DAB)、3 - 氨基 - 丙基三乙氧基硅烷 (3 - aminopropyltriethoxysilane, 简称 APES)、兔抗 sGC α 和兔抗 sGC β 等来源于 Sigma 公司; 兔多克隆抗体 nNOS (BA0360)、iNOS (BA0362)、eNOS (BA0364) 和羊抗兔 IgG (BA1054)、NOS 测定试剂盒、动物切片石蜡等均为国产试剂。

1.3 仪器

RM2235 切片机 (Leica)、HI1220 烘片机 (Leica)、YS100 显微镜 (Nikon)、iMark 酶标仪 (BioRad)、DHG - 9073BS - III 电热恒温鼓风干燥箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司)、2XZ - 2 真空泵 (郑州长城科工贸有限公司)、DZF - 6020 真空干燥箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司)、KD - P 展片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)、YD - 6D 包埋机

(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)、TY - 80S 脱色摇床 (南京大学)。

1.4 方法

1.4.1 免疫组化染色

脱蜡止水: 二甲苯 I 7 min → 二甲苯 II 7 min → 100% 乙醇 I 5 min → 100% 乙醇 II 5 min → 90% 乙醇 5 min → 70% 乙醇 2 min → 蒸馏水 5 min; 灭活内源酶: 用 3% 甲醇 - H₂O₂ 处理 15 min → 蒸馏水 5 min; 抗原热修复: 柠檬酸三钠 (pH 值 = 6.0) 100 ℃ 10 min → 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, 简称 PBS) 洗涤 3 次, 每次 3 min; 加一抗: 10% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, 简称 BSA) 室温封闭 30 min → 一抗加入后, 须要在室温条件下过夜, 阴性对照可用 1% BSA 代替 (nNOS、iNOS、eNOS 抗体稀释浓度为 1 : 100, sGC α 、sGC β 抗体稀释浓度为 1 : 2 000) → PBS 洗涤 3 次, 每次 3 min; 链霉素亲和素 - 生物素复合物 (strept avidin - biotin complex, 简称 SABC) 反应: 二抗加入后, 须要在室温条件下 30 min → PBS 洗涤 3 次, 每次 3 min → 加 SABC, 室温 15 min → PBS 洗涤 3 次, 每次 3 min; 显色: 0.05% DAB + 0.01% H₂O₂, 显色 2 ~ 10 min → 流水冲洗 5 min → 苏木素复染 → 流水冲洗 5 min; 脱水透明: 50% 乙醇 2 min → 70% 乙醇 2 min → 90% 乙醇 2 min → 100% 乙醇 I 2 min → 100% 乙醇 II 2 min → 二甲苯 I 4 min → 二甲苯 II 4 min; 封片观察。

1.4.2 卵巢组织中的酶活性测定 NOS 等活性测定方法参见笔者所在实验室前期研究方法^[15], 检测步骤参照操作说明。

1.5 数据统计

应用 Microsoft Excel 2007 对数据进行录入与处理, 计算平均数、标准差等特征值; 采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析, 差异显著性检验采用 Turkey 检验法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 NOS 在猪卵巢卵泡形成和发育过程中的表达

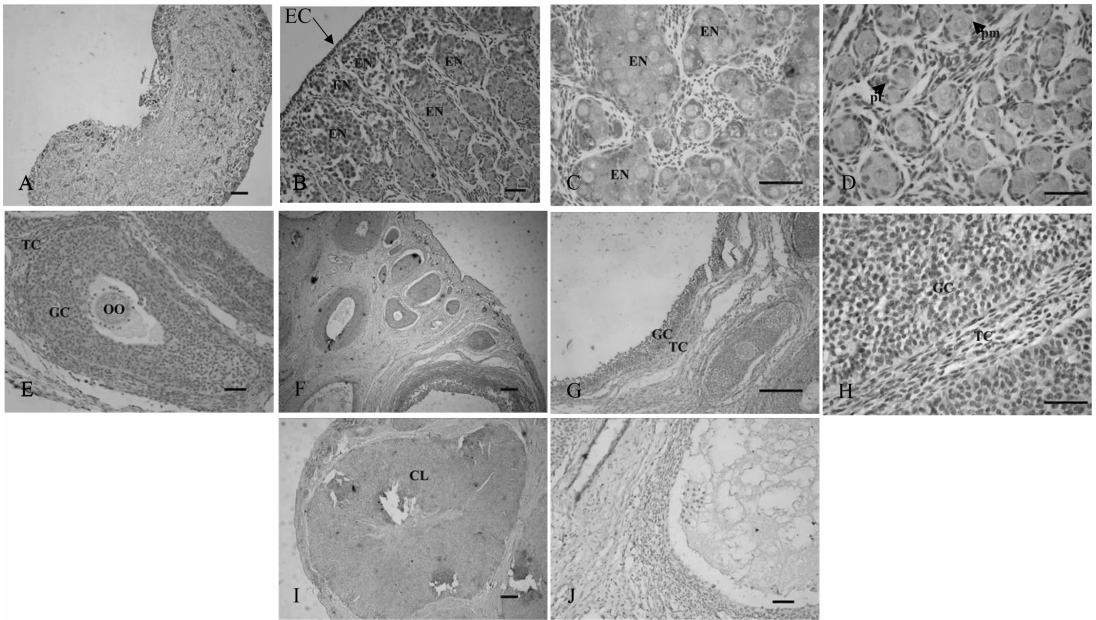
eNOS 抗体免疫组化试验结果表明, eNOS 在猪卵巢卵母细胞巢 (图 1 - A、图 1 - B、图 1 - C)、各级卵泡卵母细胞 (图 1 - D、图 1 - E)、卵巢表皮细胞 (图 1 - B) 和多层卵泡的颗粒细胞层及膜细胞层 (图 1 - F、图 1 - G、图 1 - H) 中均有表达, 且在颗粒细胞、膜细胞中的表达随着卵泡的发育而增强。此外, eNOS 在黄体 (图 1 - I) 中也有表达, 对照组无表达 (图 1 - J)。

iNOS 抗体免疫组化试验结果表明, iNOS 在卵巢表皮细胞 (图 2 - A、图 2 - G)、各级卵泡的卵母细胞 (图 2 - B、图 2 - C、图 2 - E、图 2 - G)、卵母细胞透明带 (图 2 - C、图 2 - G)、多层卵泡的颗粒细胞 (图 2 - C、图 2 - E、图 2 - F、图 2 - G)、膜细胞 (图 2 - C、图 2 - E、图 2 - F)、间质细胞 (图 2 - F)、血管内皮细胞 (图 2 - D) 和黄体细胞 (图 2 - G) 中均有表达, 但在单层卵泡的颗粒细胞层中未见表达, 对照组无表达 (图 2 - H)。

用抗 nNOS 抗体对猪卵巢组织进行免疫组织化学检测, 结果表明, nNOS 和 eNOS 的表达定位基本一致, 具体情况见图 3。

2.2 sGC $\alpha 1$ 和 sGC $\beta 1$ 在猪卵泡形成和早期发育过程中的表达

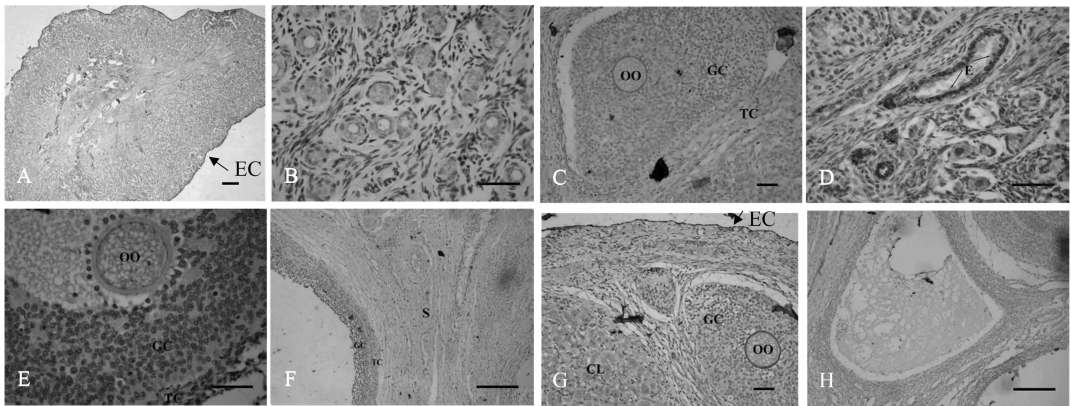
sGC $\alpha 1$ 抗体免疫组化试验结果表明, sGC $\alpha 1$ 在腔前卵泡的颗粒细胞、卵巢组织血管内皮细胞、黄体细胞、卵母细胞巢



EC 表示表皮细胞; OO 表示卵母细胞; EN 表示卵母细胞巢; GC 表示颗粒细胞; TC 表示卵泡膜细胞; CL 表示黄体; pm 表示原始卵泡; pr 表示初级卵泡。下同

A—胎猪 70 日龄; B—胎猪 90 日龄; C、D—新生 1 日龄; E~I—生后 120 日龄; J—生后 120 日龄 卵巢组织切片(对照组)。图 A、F、G、I 标尺为 200 μm ; 图 B、C、D、E、H、J 标尺为 50 μm

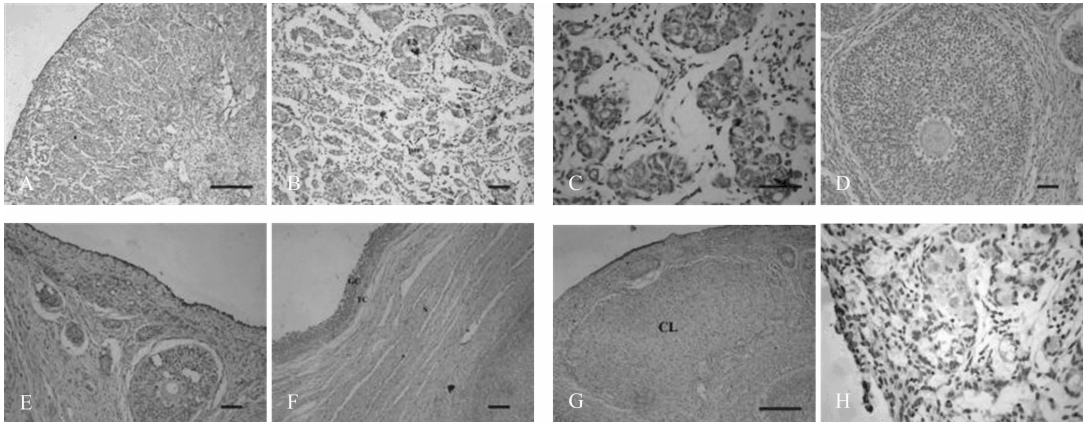
图1 eNOS 在猪卵巢卵泡中的细胞定位



E 表示血管内皮细胞; S 表示间质细胞

A—胎猪 70 日龄; B—新生 1 日龄; C~G—生后 120 日龄; H—对照。图 A 标尺为 200 μm ; 图 B、C、D、E、F、G、H 标尺为 50 μm

图2 iNOS 在猪卵巢卵泡中的细胞定位



A—胎猪 70 日龄; B—胎猪 90 日龄; C—新生 1 日龄; D~G—生后 120 日龄; H—对照。图 A 标尺为 200 μm ; 图 F 标尺为 100 μm ; 图 B、C、D、E、G、H 标尺为 50 μm

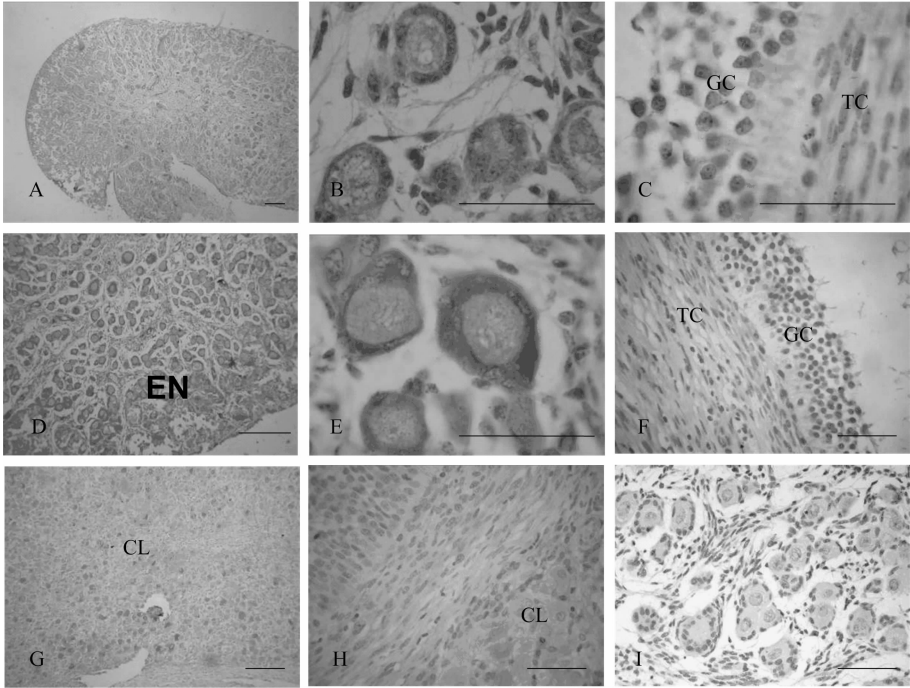
图3 nNOS 在猪卵巢卵泡中的细胞定位

中均有较强表达,在卵泡膜细胞中的表达较弱。sGCβ1 的表达位置和程度与 sGCα1 基本一致,具体情况见图 4。

2.3 卵巢中 NOS 活性测定

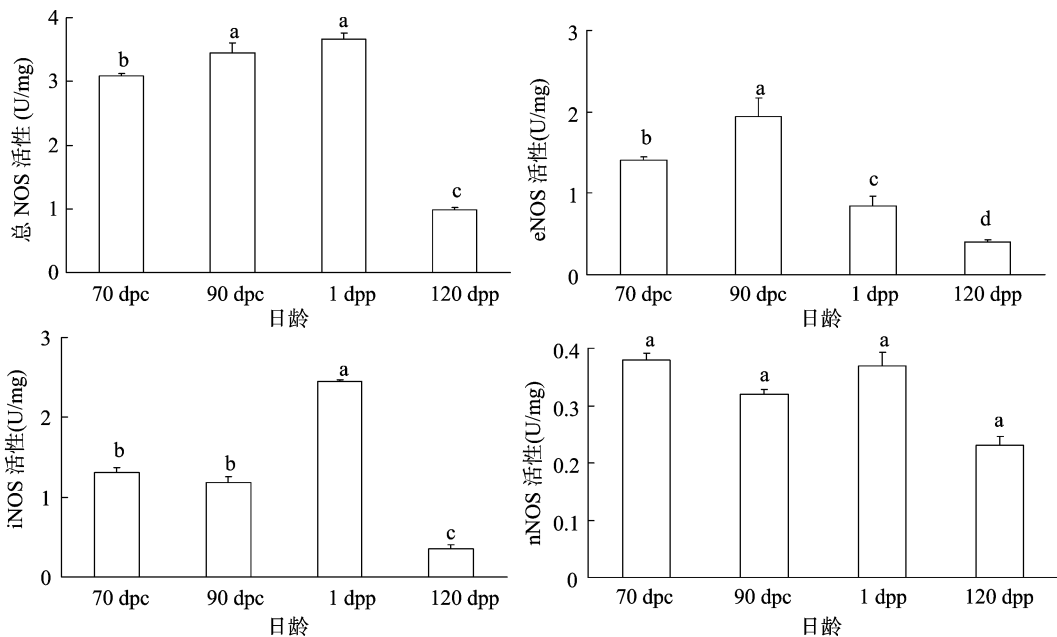
各日龄阶段猪卵巢中一氧化氮合酶活性的测定结果(图 5)表明,在出生前期,随着日龄增加,卵巢中总 NOS 活性升高,胎 70 日龄组总 NOS 活性显著低于胎 90 日龄和新生 1 日

龄组,新生 1 日龄组和胎 90 日龄组之间差异不显著,产后 120 日龄组显著低于出生前期各组;胎 90 日龄组卵巢中的 eNOS 活性显著高于其他组;新生 1 日龄组卵巢中的 iNOS 活性显著高于其他组;各组之间卵巢中的 nNOS 活性差异不显著,其中以胎 70 日龄最高,产后 120 日龄最低。



A—胎猪 70 日龄卵巢 sGCα1 抗体免疫组化; B—猪新生 1 日龄卵巢 sGCα1 抗体免疫组化; C、G—猪产后 120 日龄卵巢 sGCα1 抗体免疫组化; D—胎猪 90 日龄卵巢 sGCβ1 抗体免疫组化; E—猪新生 1 日龄卵巢 sGCβ1 抗体免疫组化; F、H—猪产后 120 日龄卵巢 sGCβ1 抗体免疫组化; I—对照; 标尺均为 50 μm

图4 sGCα1 和 sGCβ1 在猪卵巢卵泡中的细胞定位



柱上不同小写字母表示不同日龄阶段的酶活性存在显著差异(P<0.05)

图5 猪卵巢组织中一氧化氮合酶活性

3 讨论

前期研究表明,NO、NOS 在调控哺乳动物卵泡发育和卵巢功能过程中发挥重要的作用^[10,34-38],本试验对胎猪和新生仔猪卵巢中的 NOS、sGC 表达与卵泡发育进行研究,结果表明,NOS 和 sGC 在卵泡发育过程中呈细胞特异性表达。

本试验中,eNOS 主要在卵泡颗粒细胞、卵泡膜细胞、卵母细胞中表达,同时还发现,在胎猪和新生仔猪的卵巢卵母细胞中有 eNOS 表达。Jablonka-Shariff 等研究发现,在敲除 eNOS 基因的小鼠中,其卵巢有腔卵泡的数量和排卵率等指标下降显著^[38]。综合上述结果表明,在猪早期卵巢卵泡的形成和发育过程中,eNOS 发挥了重要的作用。此外,本试验中 nNOS、iNOS、eNOS 的表达定位基本一致,这与 Kim 等的试验结果^[11]基本一致。而 Matsumi 等研究表明,在大鼠卵巢中,只有 eNOS、iNOS 表达,而未检测出 nNOS^[39],说明 nNOS 的表达存在种属差异性,但在猪卵巢中,nNOS 和 eNOS、iNOS 都参与原始卵泡的形成及发育过程。

本试验中 NOS 活性测定结果表明,卵巢中总 NOS 活性,出生前期显著高于出生后 120 日龄,且从胎 70 日龄至新生 1 日龄阶段,有逐渐上升的趋势,说明 NOS 在出生前期卵巢内发挥更重要的调控作用;eNOS 在胎猪 90 日龄的卵巢中表达量最高,结合此阶段为原始卵泡形成与发育的关键时期的特点进行分析,说明 eNOS 在参与响应卵巢原始卵泡的形成和原始卵泡的激活过程中发挥了重要的作用,但仍须深入研究其具体机制。检测结果发现,iNOS 在新生 1 日龄的仔猪卵巢中表达量最高。而在哺乳动物细胞中,iNOS 极易受到细胞因子等多种物质和外部环境的影响^[9]。这可能是由于胎儿出生后,外部环境急剧改变,仔猪应激反应引起卵巢中 iNOS 表达升高。笔者所在实验室前期研究结果表明,新生卵巢组织中孕激素和雌激素的含量显著低于胎儿时期,iNOS 的阶段特异性变化是否与激素含量等因素有关,还有待进一步研究。在本试验中 nNOS 的活性明显低于 iNOS、eNOS,结合笔者所在实验室先前的研究结果,总 NOS 活性主要依赖于 eNOS、iNOS 等 2 种酶,而 nNOS 对总 NOS 活性的贡献较少^[15]。由此可以推断,在猪卵巢卵泡形成和发育过程中起主要作用的 NOS 是 eNOS、iNOS 等 2 种类型。

NO 通过激活 sGC 来提高细胞内的 cGMP 水平,以发挥多种生理作用^[40]。细胞内的 NO 能够与 sGC 的二聚体结合,活化 sGC,从而提高 cGMP 的产量^[41]。本试验首次对 sGC α 1、sGC β 1 在猪卵巢组织中的表达进行定位,结果表明,sGC 在腔前卵泡的颗粒细胞、卵巢组织血管内皮细胞、黄体细胞、卵母细胞巢中均有较强表达,在卵泡膜细胞中的表达较弱,并随着卵泡的不断发育增大,颗粒细胞中 sGC α 1、sGC β 1 的表达量下降,这一研究结果与笔者所在实验室前期在大鼠上获得的试验数据^[15,33]是一致的。随着卵泡的持续增大,sGC 表达量下降,其细胞内合成的 cGMP 量必定减少。这与前人关于 NO、cGMP 能够拮抗颗粒细胞成熟的研究结论^[42-44]是相符的。综上所述,sGC 能够调节早期卵泡的发育,且其表达水平与颗粒细胞增殖呈负相关关系。研究发现,NOS 主要在早期卵泡的卵母细胞中高表达,而 sGC 主要在颗粒细胞中表达。由于 NO 是气体分子,作为生物信使具有很强的扩散性,可以自由

通过临近细胞膜,从而发挥其调节作用,因此,虽然 NOS 主要在卵母细胞中表达,但其催化产生的 NO 可以通过气体扩散作用进入周围的颗粒细胞。

参考文献:

- [1] Jablonka-Shariff A, Olson L M. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary[J]. *Endocrinology*, 1997, 138(1): 460-468.
- [2] Dixit V D, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction[J]. *Animal Reproduction Science*, 2001, 65(1/2): 1-16.
- [3] Matsumi H, Koji T, Yano T, et al. Evidence for an inverse relationship between apoptosis and inducible nitric oxide synthase expression in rat granulosa cells: a possible role of nitric oxide in ovarian follicle atresia[J]. *Endocrine Journal*, 1998, 45(6): 745-751.
- [4] Rosselli M, Keller P J, Dubey R K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction[J]. *Human Reproduction Update*, 1998, 4(1): 3-24.
- [5] Tamanini C, Basini G, Grasselli F, et al. Nitric oxide and the ovary[J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81(14): E1-E7.
- [6] Bredt D S, Hwang P M, Snyder S H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide[J]. *Nature*, 1990, 347(6295): 768-770.
- [7] Bredt D S, Hwang P M, Glatt C E, et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase[J]. *Nature*, 1991, 351(6329): 714-718.
- [8] Venema R C, Nishida K, Alexander R W, et al. Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1218(3): 413-420.
- [9] Stuehr D J, Cho H J, Kwon N S, et al. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(17): 7773-7777.
- [10] Grazul-Bilska A T, Navanukraw C, Johnson M L, et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the estrous cycle[J]. *Reproduction*, 2006, 132(4): 579-587.
- [11] Kim H, Moon C, Ahn M, et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2005, 6(2): 97-101.
- [12] Tao Y, Fu Z, Zhang M J, et al. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004, 222(1/2): 93-103.
- [13] Voorhis B J V, Moore K, Stribos P J, et al. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation *in vivo*[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 96(6): 2719-2726.
- [14] Mitchell L M, Kennedy C R, Hartshorne G M. Expression of nitric oxide synthase and effect of substrate manipulation of the nitric oxide pathway in mouse ovarian follicles[J]. *Human Reproduction*, 2004, 19(1): 30-40.
- [15] Zhang W, Wei Q W, Wang Z C, et al. Cell-specific expression and immunolocalization of nitric oxide synthase isoforms and the related

- nitric oxide/cyclic GMP signaling pathway in the ovaries of neonatal and immature rats[J]. Journal of Zhejiang University – Science B, 2011,12(1):55–64.
- [16] Zackrisson U, Mikuni M, Wallin A, et al. Cell – specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation [J]. Human Reproduction, 1996, 11(12):2667–2673.
- [17] Nakamura Y, Kashida S, Nakata M, et al. Changes in nitric oxide synthase activity in the ovary of gonadotropin treated rats; the role of nitric oxide during ovulation[J]. Endocrine Journal, 1999, 46(4):529–538.
- [18] Yamagata Y, Nakamura Y, Sugino N, et al. Alterations in nitrate/nitrite and nitric oxide synthase in preovulatory follicles in gonadotropin – primed immature rat[J]. Endocrine Journal, 2002, 49(2):219–226.
- [19] Tao M, Kodama H, Kagabu S, et al. Possible contribution of follicular interleukin – 1b to nitric oxide Generation in human pre – ovulatory follicles[J]. Human Reproduction, 1997, 12(10):2220–2225.
- [20] Zhou L B, Bai R, Tian J X, et al. Bioinformatic comparisons and tissue expression of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene from the red drum (*Sciaenops ocellatus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(4):577–584.
- [21] Nakane M, Schmidt H H, Pollock J S, et al. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle[J]. FEBS Letters, 1993, 316(2):175–180.
- [22] Burnett A L, Lowenstein C J, Bredt D S, et al. Nitric oxide; a physiologic mediator of penile erection [J]. Science, 1992, 257(568):401–403.
- [23] Grasselli F, Ponderato N, Basini G, et al. Nitric oxide synthesis expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine cumulus cells[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2001, 20(4):241–252.
- [24] Hattori M A, Takesue K, Kato Y, et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the porcine oocyte and its possible function [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2001, 219(1/2):121–126.
- [25] Takesue K, Tabata S, Sato F, et al. Expression of nitric oxide synthase – 3 in porcine oocytes obtained at different follicular development[J]. The Journal of Reproduction and Development, 2003, 49(2):135–140.
- [26] Törnell J, Billig H, Hillensjö T. Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides [J]. Human Reproduction, 1991, 6(3):411–422.
- [27] Sirotkin A V, Makarevich A V, Genieser H G, et al. Effect of four cGMP analogues with different mechanisms of action on hormone release by porcine ovarian granulosa cells in vitro[J]. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes; Official Journal, German Society of Endocrinology[and] German Diabetes Association, 2000, 108(3):214–219.
- [28] Nakamura Y, Yamagata Y, Sugino N, et al. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation [J]. Biology of Reproduction, 2002, 67(5):1588–1592.
- [29] Chen Y H, Tafoya M, Ngo A, et al. Effects of nitric oxide and cGMP on inhibin A and inhibin subunit mRNA levels from cultured rat granulosa cells[J]. Fertility and Sterility, 2003, 79(s1):687–693.
- [30] Lapolt P S, Leung K, Ishimaru R, et al. Roles of cyclic GMP in modulating ovarian functions [J]. Reproductive BioMedicine Online, 2003, 6(1):15–23.
- [31] Koesling D, Friebe A. Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation [M]//Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Heidelberg:Springer, 1999, 135:41–65.
- [32] Gupta G, Azam M, Yang L, et al. The $\beta 2$ subunit inhibits stimulation of the $\alpha 1/\beta 1$ form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide[J]. Journal of Clinical Investigation, 1997, 100(6):1488–1492.
- [33] Shi F, Stewart R L, Perez E, et al. Cell – specific expression and regulation of soluble guanylyl cyclase $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits in the rat ovary[J]. Biology of Reproduction, 2004, 70(6):1552–1561.
- [34] Rosselli M. Nitric oxide and reproduction[J]. Molecular Human Reproduction, 1997, 3(8):639–641.
- [35] Burnett A L, Ricker D D, Chamness S L, et al. Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat [J]. Biology of Reproduction, 1995, 52(1):1–7.
- [36] Nishikimi A, Matsukawa T, Hoshino K, et al. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice [J]. Reproduction, 2001, 122(6):957–963.
- [37] Pallares P, Garcia – Fernandez R A, Criado L M, et al. Disruption of the endothelial nitric oxide synthase gene affects ovulation, fertilization and early embryo survival in a knockout mouse model [J]. Reproduction, 2008, 136(5):573–579.
- [38] Jablonka – Shariff A, Ravi S, Beltsos A N, et al. Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice[J]. Biology of Reproduction, 1999, 61(1):171–177.
- [39] Matsumi H, Yano T, Koji T, et al. Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary; a possible involvement of nitric oxide in the follicular development [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 243(1):67–72.
- [40] Bellamy T C, Wood J, Goodwin D A, et al. Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(6):2928–2933.
- [41] Arnold W P, Aldred R, Murad F. Cigarette smoke activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5' – monophosphate in tissues[J]. Science, 1977, 198(4320):934–936.
- [42] Chen Y H J, Tafoya M S, Ngo A, et al. Effects of nitric oxide and cGMP on inhibin A and inhibin subunit mRNA levels from cultured rat granulosa cells[J]. Fertility and Sterility, 2003, 79(S1):687–693.
- [43] Ishimaru R S, Leung K, Hong L, et al. Inhibitory effects of nitric oxide on estrogen production and cAMP levels in rat granulosa cell cultures[J]. Journal of Endocrinology, 2001, 168(2):249–255.
- [44] Masuda M, Kubota T, Aso T. Effects of nitric oxide on steroidogenesis in porcine granulosa cells during different stages of follicular development [J]. European Journal of Endocrinology, 2001, 144(3):303–308.