

丁 威, 邢 军, 魏全伟, 等. 二花脸猪卵巢卵泡形成和早期发育过程中雌二醇和孕酮含量变化及其受体定位[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 383-389.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.02.023

## 二花脸猪卵巢卵泡形成和早期发育过程中雌二醇和孕酮含量变化及其受体定位

丁 威<sup>1,2</sup>, 邢 军<sup>1,2</sup>, 魏全伟<sup>2</sup>, 石放雄<sup>2</sup>

(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)

**摘要:** 为了研究雌二醇( $E_2$ )和孕酮( $P_4$ )在猪卵巢卵泡形成和早期发育过程中可能的作用, 本试验以胎 70 日龄、90 日龄和新生 1 日龄 3 个阶段的母猪为试验动物, 通过免疫组织化学方法对胎猪和新生仔猪卵巢组织中的雌二醇受体(ER)和孕激素受体(PR)进行定位分析。通过放射免疫测定法对胎猪和新生仔猪的卵巢组织和血清中 $E_2$ 及 $P_4$ 含量进行测定, 并分析 $E_2$ 和 $P_4$ 水平与猪的卵泡形成的相关性。结果显示: 在猪早期阶段卵巢中 ER 主要在卵巢表皮细胞, 卵母细胞巢中的卵原细胞和卵母细胞, 以及原始卵泡、初级卵泡和次级卵泡的卵母细胞和颗粒细胞的核中表达, PR 主要在卵巢表皮细胞, 卵母细胞核, 原始卵泡和初级卵泡的颗粒细胞的核中表达; 随着胎龄的增加, 卵巢中的 $E_2$ 和 $P_4$ 水平下降, 并且与卵泡的形成和发育呈负相关。说明出生前猪卵巢组织中的 $E_2$ 和 $P_4$ 含量变化可能影响猪卵巢卵泡的形成和早期发育。

**关键词:** 猪; 卵巢; 雌二醇; 孕酮

中图分类号: S828 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2016)02-0383-07

## Changes in concentrations of estradiol and progesterone during ovarian follicular development and localization of ovarian estradiol receptor (ER) and progesterone receptor (PR) in the fetal and neonatal Erhualian swines

DING Wei<sup>1,2</sup>, XING Jun<sup>1,2</sup>, WEI Quan-wei<sup>2</sup>, SHI Fang-xiong<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Jurong 212400, China; 2. College of Animal Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** To investigate the effects of estradiol and progesterone on porcine ovarian follicular formation and development, the ovaries of 70 days postcoitum (dpc), 90 dpc, and 1 day postpartum (dpp) were used to detect the localization of estradiol receptor (ER) and progesterone receptor (PR) by immunohistochemistry, respectively. ERs were expressed primarily in ovarian epidermal cells, oogonia and oocytes in the egg nests, nuclei of oocytes and granulosa cells of follicles from primordial to secondary stages. The expression pattern of PR was similar to the ERs. The radioimmunoassay (RIA) findings implied

that ovarian levels of estradiol and progesterone were reduced as the fetus aged. There were negative correlations between the number of follicles and the concentrations of estradiol and progesterone. Taken together, our findings suggested that estradiol and progesterone might play a potential role in follicular formation and development in fetal and neonatal pigs.

**Key words:** pig; ovary; estradiol; progesterone

收稿日期: 2015-08-31

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2011499)

作者简介: 丁 威 (1979-), 男, 黑龙江省巴彦县人, 博士研究生, 副教授, 主要从事猪的卵巢卵泡发育调控机制研究。(Tel) 0511-87292202; (E-mail) qishi6598@126.com

通讯作者: 石放雄, (E-mail) fxshi@njau.edu.cn

在雌性动物卵巢分化的初期,原始生殖细胞成簇出现,形成卵母细胞巢,在卵巢发育过程中卵母细胞巢中的卵母细胞不断发生凋亡,形成更小级别的卵母细胞巢,最终裂解的卵母细胞巢被颗粒细胞包裹后形成单个原始卵泡<sup>[1-2]</sup>。原始卵泡的形成和发育直接影响雌性动物整个生育阶段的可用卵泡数量<sup>[3-4]</sup>。在猪卵泡发育过程中,胚胎时期是卵母细胞凋亡的关键阶段,大量的研究结果也显示不存在可再生的原始卵泡。因此减少胚胎时期卵母细胞的凋亡,提高原始卵泡数目对提高排卵率及繁殖力具有积极的意义。目前雌激素和孕激素在卵母细胞抗凋亡方面越来越引起人们的注意。研究发现雌激素和孕激素能阻止小鼠卵巢中卵母细胞巢的裂解和原始卵泡的组装<sup>[5-6]</sup>。在卵巢发育过程中,雌激素能够降低卵母细胞的凋亡<sup>[7]</sup>,这为我们提高初生母猪的原始卵泡库容量,进而提高母猪的排卵率提供了理论支持。两种激素对细胞凋亡和增殖的影响主要是通过与其相应受体结合后由非基因组机制所介导调控。目前认为雌激素受体存在两种亚型:即ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 。在妊娠母猪体内,ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 在猪卵巢中均有表达,但表达部位存在差异<sup>[8]</sup>。在胎儿卵巢中,ER $\beta$ 在卵巢基质中卵母细胞巢外周表达,而ER $\alpha$ 仅在卵巢上皮细胞中表达<sup>[9]</sup>。孕激素也有两种受体(PR-A、PR-B),PR在牛、猪和羊等动物卵巢组织中均有表达<sup>[10-12]</sup>。虽然有关两种激素在猪卵泡发育过程中的调控作用已有相关报道,但有关雌激素和孕激素及其受体在胎儿和出生期卵巢组织中的水平和表达部位及与原始卵泡库分解的关系,国内外还鲜有研究。

## 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,由南京禾嘉吉升农牧发展有限公司种猪场提供,采用本品种饲养标准进行饲料配制饲养。试验全程采用舍饲,自由采食,自由饮水。观察两个自然发情周期后,于发情周期开始的24 h进行配种,间隔12~24 h复配1~2次,怀孕天数从第一次配种日期开始计算。胎70日龄(70 dpc)、胎90日龄(90 dpc)、新生1日龄(1 dpp)二花脸母猪各5头。猪屠宰后迅速采集血样和卵巢组织,一侧卵巢放于4%多聚甲醛

中固定36~48 h,以备组织学分析;另一侧卵巢置于液氮保存,用于激素测定。

### 1.2 试剂

兔抗ER $\alpha$ 多克隆抗体和兔抗ER $\beta$ 多克隆抗体购自博士德(中国武汉,BA03045),兔多克隆抗体PR-Ab13购自Thermo Co.(Runcorn, Cheshire, UK, Cat. #RB-1492),免疫组织化学试剂盒(SABC方法)购自博士德(中国武汉,SA1021),DAB购自于Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 方法

1.3.1 卵巢组织的免疫组织化学染色 脱蜡止水:二甲苯7 min→二甲苯7 min→100%酒精I 5 min→100%酒精II 5 min→90%酒精5 min→70%酒精2 min→蒸馏水5 min;灭活内源酶:用3%甲醇-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理15 min→蒸馏水5 min;抗原热修复:柠檬酸三钠(pH 6.0)100℃10 min→PBS洗涤3次,每次3 min加一抗:10% BSA室温封闭30 min→加一抗室温过夜,对照组用1% BSA代替(ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 按照1:100稀释,PR按照1:200稀释)→PBS洗涤3次,每次3 min;SABC反应:加相应二抗,室温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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,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%酒精2 min→70%酒精2 min→90%酒精2 min→100%酒精I 2 min→100%酒精II 2 min→二甲苯I 4 min→二甲苯II 4 min;封片观察。

1.3.2 类固醇激素含量测定 采用放射免疫测定法检测胎猪血卵巢组织孕酮(P<sub>4</sub>)及雌二醇(E<sub>2</sub>)含量。方法如下:胎猪全血自然凝结后,离心得血清;卵巢称质量后在1 ml PBS中匀浆得卵巢匀浆液(匀浆液以牛血清蛋白BSA校正)。放射免疫测定过程均在南京军区总医院检测中心完成。

### 1.4 数据统计

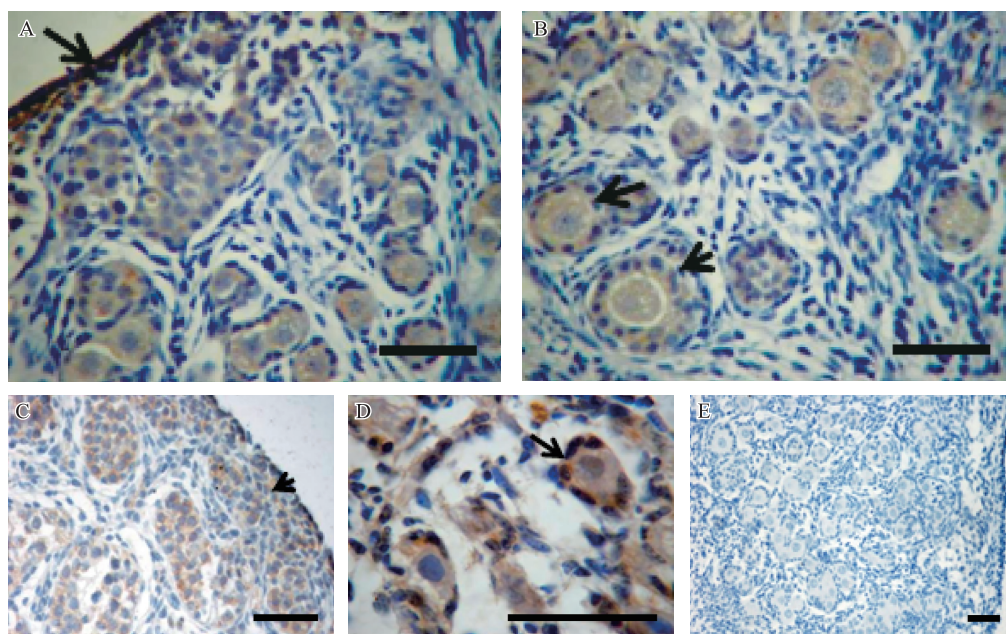
所有数据均用平均值±标准误差表示,且所有试验均重复4次以上。试验数据采用SPSS17.0统计软件进行处理,经单因素方差分析(ANOVA),差异显著性检验采用Turkey检验法进行多重比较,激素水平与卵泡形成数据采用单变量的相关性分析。

## 2 结果

### 2.1 雌激素受体在胎猪和新生仔猪卵巢组织中的表达

用抗 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  抗体对二花脸胎猪和新生仔猪卵巢组织进行免疫组织化学检测,结果显示:ER $\alpha$

主要在卵巢表皮细胞、卵母细胞巢中的卵原细胞和卵母细胞(图 1A)以及原始卵泡、初级卵泡和次级卵泡的卵母细胞和颗粒细胞(图 1B)中表达;ER $\beta$  与 ER $\alpha$  的表达部位相似,但是 ER $\beta$  表达强度高于 ER $\alpha$ ,且在原始卵泡的颗粒细胞的胞核中有较强表达(图 1C、图 1D)。阴性对照无表达(图 1E)。



A: 胎猪 90 日龄卵巢 ER $\alpha$  抗体;B:猪新生 1 日龄卵巢 ER $\alpha$  抗体;C:胎猪 90 日龄卵巢 ER $\beta$  抗体;D:猪新生 1 日龄卵巢 ER $\beta$  抗体;E:胎猪 90 日龄卵巢组织切片(对照组)。

图 1 ERs 在胎猪和新生仔猪卵巢卵泡中的细胞定位

Fig.1 Cellular localization of ERs in the ovarian follicle of fetal and neonatal pigs

### 2.2 孕激素受体在胎猪和新生仔猪卵巢组织中的表达

用抗 PR 抗体对胎猪和新生仔猪卵巢组织进行免疫组织化学检测,结果表明:PR 主要在卵巢表皮细胞(图 2A)、卵母细胞胞核(图 2C)以及原始卵泡和初级卵泡颗粒细胞(图 2B)中表达,阴性对照无表达(图 2D)。

### 2.3 胎猪和新生仔猪血清和卵巢组织中 E<sub>2</sub> 的水平

用放射免疫测定法检测不同日龄胎猪和新生仔猪血清和卵巢组织匀浆液中雌激素(E<sub>2</sub>)的浓度(图 3)显示,随着日龄的变化,血清中 E<sub>2</sub> 的浓度有下降趋势,但各测定组间差异不显著( $P>0.05$ )(图 3 I);随着日龄的增长,卵巢组织中 E<sub>2</sub> 浓度逐渐降低,且差异极显著( $P<0.01$ )(图 3 II)。

### 2.4 胎猪和新生仔猪血清和卵巢组织中 P<sub>4</sub> 的水平

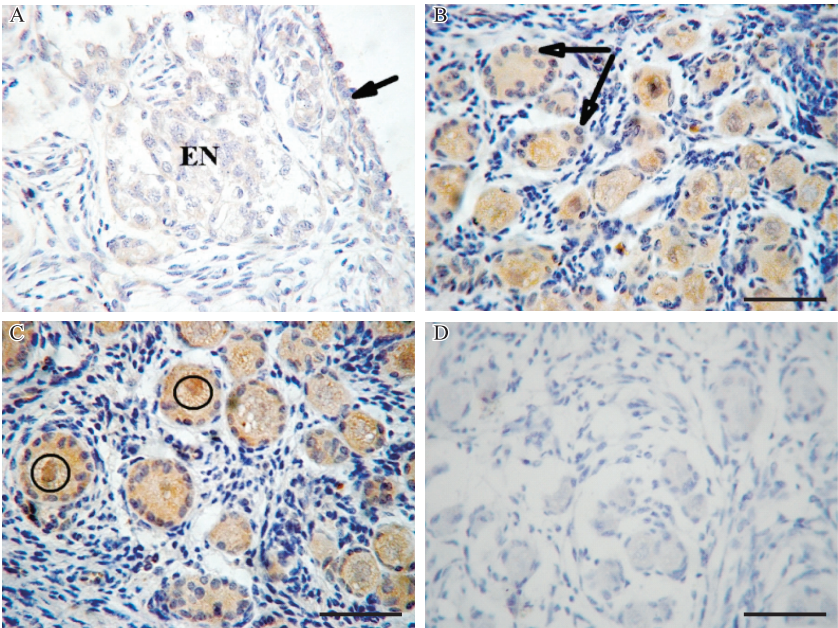
用放射免疫测定法检测不同日龄猪血清和卵巢组织匀浆液中 P<sub>4</sub> 的浓度,如图 4 所示。血清中的 P<sub>4</sub> 浓度较低,不同日龄的胎猪和新生仔猪血清中的 P<sub>4</sub> 浓度之间差异不显著( $P>0.05$ )(图 4 I);而随着日龄的增长,卵巢组织中 P<sub>4</sub> 浓度逐渐降低,且差异极显著( $P<0.01$ )(图 4 II)。

### 2.5 E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 水平与卵巢卵泡比例的相关性分析

分别将 70 dpc、90 dpc 和 1 dpp 猪卵巢中 E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 水平与上述日龄阶段中的卵巢中单个卵泡的比例关系进行相关性分析,结果表明: $r_{E_2} = -0.9875^*$ ;  $r_{P_4} = -0.9718^*$ ,说明卵巢中的 E<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 水平与卵巢卵泡数量呈强负相关(表 1)。

此外,我们将 70 dpc、90 dpc 和 1 dpp 猪卵巢中

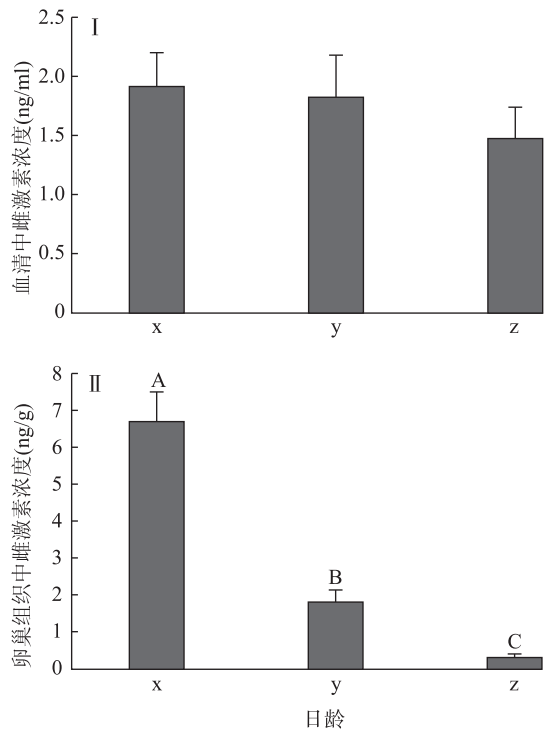




A:胎猪 70 日龄; B:胎猪 90 日龄; C:新生 1 日龄; D:对照。标尺:50  $\mu\text{m}$ 。

图 2 PR 在胎猪和新生仔猪卵巢卵泡中的细胞定位

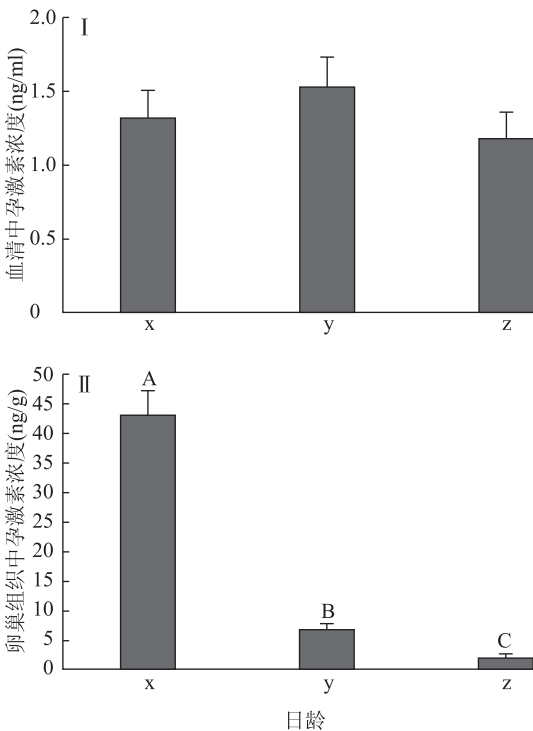
Fig.2 Cellular localization of PR in the ovarian follicle of fetal and neonatal pigs



大写字母不同表示差异极显著 ( $P < 0.01$ );  $n = 5$ 。x:胎 70 日龄; y:胎 90 日龄; z:新生 1 日龄。

图 3 猪血清和卵巢组织中雌激素水平

Fig.3 Concentration of estradiol in porcine blood serum and ovaries



大写字母不同表示差异极显著 ( $P < 0.01$ );  $n = 5$ 。x、y 和 z 见图 3 注。

图 4 猪血清和卵巢组织中孕激素水平

Fig.4 Concentration of progesterone in porcine blood serum and ovaries

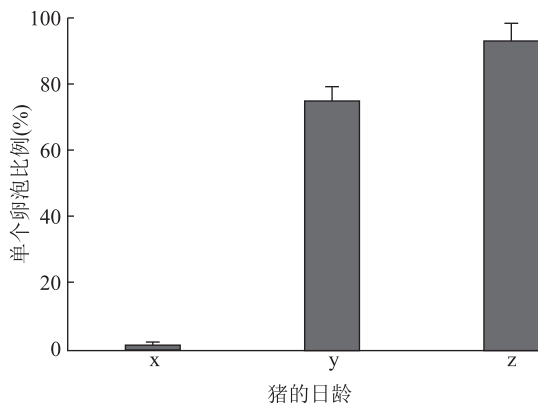
表 1 雌激素和孕激素与卵巢卵泡比例的相关性分析

Table 1 Correlations between  $E_2/P_4$  and percentage of single follicle

激素	$r$	$P$
$E_2$	-0.987 5	0.002 **
$P_4$	-0.971 8	0.005 **

\*\* 表示差异达极显著 ( $P < 0.01$ )。

$E_2$  和  $P_4$  水平变化与该阶段中卵巢单个卵泡的比例综合分析,可以发现,随着胎龄的增加, $E_2$  和  $P_4$  水平逐渐下降,而卵巢中单个卵泡的比例逐渐升高(图 5)。



x、y、z 见图 3 注。

图 5 猪卵巢中单个卵泡比例

Fig.5 Percentage of single follicles in swine ovaries

### 3 讨论

#### 3.1 $E_2$ 对猪早期卵泡形成和发育的影响

研究结果表明,ER $\alpha$  敲除小鼠都表现出严重的卵巢发育异常,通常是由于卵泡成熟后的排卵失败导致卵巢出血性囊肿,最终导致不育<sup>[13-14]</sup>。但也有研究报道显示,缺少雌激素受体的小鼠可以进行正常的卵巢发育<sup>[15]</sup>。而多数研究报道表明,不同物种间雌激素受体表达存在一定的差异,如 Jefferson 等发现小鼠的卵泡膜细胞中不表达 ER $\beta$ <sup>[16]</sup>,而 Slomczynska 等发现猪的卵泡膜细胞表达 ER $\beta$ <sup>[17]</sup>。但普遍认为,在卵泡生长中起主要作用的是 ER $\beta$ <sup>[16,18-20]</sup>。Jennifer 等试验结果表明,ER $\alpha$  和 ER $\beta$  在胎儿卵巢组织中的表达,随着胎儿日龄的变化而有所不同<sup>[21]</sup>。本研究结果表明:ER $\alpha$  和 ER $\beta$  主要在卵巢表皮细胞、卵母细胞巢中的卵原细胞和卵母细胞、原始卵泡、初级卵泡和次级卵泡的卵母细胞和颗粒细

胞细胞核中表达,但 ER $\beta$  的表达明显强于 ER $\alpha$ 。据此推测,ER $\beta$  在卵泡的早期生长发育中可能起主要作用。

此外,有研究结果表明,雌激素作为卵巢内的调节因子,其作用存在物种间差异。小鼠的卵巢在胎儿时期不产生雌激素<sup>[22]</sup>。但在其他很多物种中,卵巢发育却依赖于雌激素<sup>[23]</sup>。本试验激素测定结果表明:在 70 dpc 至 1 dpp 猪卵巢中, $E_2$  含量随着胎龄的增加逐渐下降,而血清中  $E_2$  含量变化差异不显著。说明在胎儿时期,卵巢中的  $E_2$  水平比血清中的变化明显,卵巢中的  $E_2$  水平的改变才是调节卵巢卵泡形成和发育的因素。

#### 3.2 $P_4$ 对猪早期卵泡形成和发育的影响

哺乳动物性腺分化时能合成类固醇激素<sup>[24]</sup>。Yang 等试验发现胎牛卵巢能够产生  $P_4$  和  $E_2$ ,并且其水平随胎龄增加而降低<sup>[25]</sup>。Echternkamp 等研究发现,在胎牛 60~103 日龄的卵巢中孕激素水平显著减少,但同时期的孕牛血中的孕激素却无变化<sup>[26]</sup>。本试验结果表明,在 70 dpc 和 1 dpp 之间,猪血清中的  $P_4$  含量在各阶段变化不大,而随着胎龄增加,卵巢内的  $P_4$  水平显著降低,与上述报道相似。这说明猪卵巢和血清中的  $P_4$  调节可能是相对独立的。

有报道显示,PR 敲除小鼠的卵巢卵泡只能发育到三级卵泡<sup>[27]</sup>。与 PR-B 相比,PR-A 在正常卵巢功能的发挥过程中是必需的<sup>[27-29]</sup>。此外,D'Haeleleer 等报道,在牛的卵巢中 PR 主要在原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡的颗粒细胞和卵母细胞中表达,且在颗粒细胞中的表达随着卵泡的生长而逐渐增加直至卵泡成熟<sup>[10]</sup>。Słomczyńska 等的研究结果表明,猪的卵巢组织中,PR 在小的有腔卵泡的颗粒细胞层有表达,在膜细胞层没有表达,而在大的有腔卵泡的颗粒细胞层、膜细胞层及黄体细胞中均有表达<sup>[11]</sup>。Jennifer 等试验结果证实,在胎儿、新生和成年绵羊的卵巢中,PR 在卵巢表皮细胞、间质细胞、卵泡颗粒细胞和膜细胞中均有表达<sup>[12]</sup>。本试验中,PR 在卵巢表皮细胞、卵母细胞胞核以及原始卵泡和初级卵泡颗粒细胞中均有表达,但在间质细胞中未见表达,说明 PR 的表达可能存在种属特异性。

#### 3.3 $E_2$ 和 $P_4$ 与卵泡形成的相关性分析

研究结果表明,高浓度的雌激素和(或)孕激素能够抑制卵泡的形成<sup>[5,7,30]</sup>。本试验结果表明,卵巢

中  $E_2$  和  $P_4$  水平与卵巢中单个卵泡的比例呈极显著负相关,说明  $E_2$  和  $P_4$  的水平确实对原始卵泡的形成具有负调节作用。而其可能的调节机制是高水平的卵巢甾体激素抑制原始卵泡组装,当卵巢甾体激素水平下降后,通过诱导局部生长因子,从而启动原始卵泡的组装<sup>[31]</sup>。此外,还有研究推测这可能是由于在妊娠期间原始卵泡的非正常组装和发育可能导致内分泌紊乱或卵母细胞进入减数分裂阶段所致。因此,机体在进化过程中产生了抑制原始卵泡非正常发育的机制。由于孕激素是怀孕和胎儿生长发育所必需的,而高水平的孕激素能够抑制妊娠期胎儿卵巢中的卵泡形成,这种内分泌模式是有益于进化的<sup>[6]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] PEPLING M E, SPRADLING A C. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts [J]. *Development*, 1998, 125: 3323-3328.
- [2] PEPLING M E, D E CUEVAS M, SPRADLING A C. Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? [J]. *Trends Cell Biol*, 1999, 9: 257-262.
- [3] JOHNSON J, BAGLEY J, SKAZNIK-WIKIEL M, et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood [J]. *Cell*, 2005, 122: 303-315.
- [4] JOHNSON J, CANNING J, KANEKO T, et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary [J]. *Nature*, 2004, 428: 145-150.
- [5] CHEN Y, JEFFERSON W N, NEWBOLD R R, et al. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo [J]. *Endocrinology*, 2007, 148: 3580-3590.
- [6] NILSSON E E, SKINNER M K. Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 313(1-2): 9-16.
- [7] JEFFERSON W, NEWBOLD R, PADILLA-BANKS E, et al. Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival [J]. *Biol Reprod*, 2006, 74: 161-168.
- [8] KNAPCZYK K, DUDA M, SZAFRANSKA B, et al. Immunolocalisation of oestrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) in porcine embryos and fetuses at different stages of gestation [J]. *Acta Vet Hung*, 2008, 56: 221-233.
- [9] KNAPCZYK K, DUDA M, DURLEJ M, et al. Expression of estrogen receptor alpha (ERalpha) and estrogen receptor beta (ERbeta) in the ovarian follicles and corpora lutea of pregnant swine [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2008, 35: 170-179.
- [10] D'HAESELEER M, SIMOENS P, VAN DEN BROECK W. Cell-specific localization of progesterone receptors in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle [J]. *Anim Reprod Sci*, 2007, 98(3-4): 271-81.
- [11] SŁOMCZYŃSKA M, MAŁGORZATA K. Localization of the progesterone receptor in the porcine ovary [J]. *Acta Histochemica*, 2007, 102(2): 183-191.
- [12] JENNIFER L J, DEREK A H, LAUREL D Q, et al. Oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ , and rogen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep [J]. *Reproduction*, 2006, 131: 81-92.
- [13] LUBAHN D B, MOYER J S, GOLDING T S, et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 11162-11166.
- [14] DUPONT S, KRUST A, GANSMULLER A, et al. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) on mouse reproductive phenotypes [J]. *Development*, 2000, 127: 4277-4291.
- [15] LUN S, SMITH P, LUNDY T, et al. Steroid contents and steroidogenesis *in vitro* by the developing gonad and mesonephros around sexual differentiation in fetal sheep [J]. *J Reprod Fertil*, 1998, 114(1): 131-139.
- [16] JEFFERSON W N, COUSE J F, BANKS E P, et al. Expression of estrogen receptor  $\beta$  is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(2): 310-317.
- [17] SŁOMCZYŃSKA M, WOZNIAK J. Differential distribution of estrogen receptor  $\beta$  and estrogen receptor  $\alpha$  in the porcine ovary [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001, 109(4): 238-244.
- [18] PELLETIER G, LABRIE C, LABRIE F. Localization of oestrogen receptor  $\alpha$ , oestrogen receptor  $\beta$  and androgen receptors in the rat reproductive organs [J]. *J Endocrinol*, 2000, 165(2): 359-370.
- [19] PELLETIER G, EL-ALFY M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human reproductive organ [J]. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2000, 85(12): 4835-4840.
- [20] PEPE G J, BILLIAR R B, LEAVITT M G, et al. Expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the baboon fetal ovary [J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(4): 1054-1060.
- [21] JENNIFER L JUENGEL, DEREK A HEATH, LAUREL D QUIRKE, et al. Oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ , androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localization within the developing ovary and in small growing follicles of sheep [J]. *Reproduction*, 2006, 131: 81-92.
- [22] GRECO T, PAYNE A H. Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads [J]. *Endocrinology*, 1994, 135(1): 262-268.

- [23] COUSE J F, KORACH K S. Estrogen receptor null mice; what have we learned and where will they lead us? [J]. *Endocr Rev*, 1999, 20 (3): 358-417.
- [24] HUNTER R H F. Sex determination, differentiation and intersexuality in placental mammals [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- [25] YANG M Y, FORTUNE J E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes [J]. *Biol Reprod*, 2008, 78: 1153-1161.
- [26] ECHTERNKAMP S E, VONNAHME K A, GREEN J A, et al. Increased vascular endothelial growth factor and pregnancy-associated glycoproteins, but not insulin-like growth factor-I, in maternal blood of cows gestating twin fetuses [J]. *J Anim Sci*, 2006, 84: 2057-2064.
- [27] LYDON J P, DEMAYO F J, FUNK C R, et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities [J]. *Genes Dev*, 1995, 9: 2266-2278.
- [28] JERICEVIC B M, MULLINAX R A, DEMAYO F J, et al. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform [J]. *Science*, 2000, 289: 1751-1754.
- [29] JERICEVIC B M, LYDON J P, DEMAYO F J, et al. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 9744-9749.
- [30] LEI L, JIN S, MAYO K E, et al. The interactions between the stimulatory effect of follicle-stimulating hormone and the inhibitory effect of estrogen on mouse primordial folliculogenesis [J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(1):13-22.
- [31] KEZELE P, SKINNER M K. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly [J]. *Endocrinology*, 2003, 144 (8): 3329-3337.

(责任编辑:陈海霞)