

湖羊 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达水平 与排卵数关系的研究

徐业芬^{1,2}, 李齐发¹, 李二林¹, 涂飞¹, 胡冬利¹, 谢庄¹, 陈玲³

(¹南京农业大学动物科技学院, 南京 210095; ²西藏大学农牧学院, 西藏林芝 860000; ³江苏省苏州种羊场, 江苏苏州 215000)

摘要: 【目的】研究湖羊卵巢组织 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达水平与排卵数的相关性, 筛选影响湖羊多胎性状的候选基因, 为揭示湖羊高繁多胎分子遗传机理提供参考。【方法】选取 16 只经产湖羊母羊, 分为产单羔组和多羔组, 发情后 24~36 h 屠宰, 取卵巢, 计数排卵点, 记录排卵数; 应用 RT-PCR 技术检测 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因的组织表达特征, 进一步利用实时荧光定量 PCR 技术分析各基因 mRNA 在单羔组和多羔组卵巢组织中的表达差异。【结果】*BMP2*、*BMP4* 和 *BMP7* 基因在湖羊母羊卵巢组织内表达, 而且在垂体及下丘脑、子宫、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、输卵管组织中均有表达; *BMP6* 基因仅在湖羊母羊卵巢、肾脏、肌肉和输卵管组织中表达。在卵巢组织, 多羔组排卵数极显著高于单羔组 ($P < 0.01$), 且多羔组 *BMP4* 基因 mRNA 表达极显著高于单羔组 ($P < 0.01$), 而 *BMP2*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达在单羔组和多羔组间无显著差异 ($P > 0.05$); 相关分析表明在卵巢组织中, 只有 *BMP4* 基因 mRNA 表达与排卵数呈正相关 ($r = 0.741$, $P < 0.05$)。【结论】*BMP4* 基因 mRNA 表达在单羔组和多羔组间差异显著, 可能对湖羊排卵数起关键作用, 是影响湖羊排卵数的候选基因。

关键词: 湖羊; 排卵数; *BMP2*; *BMP4*; *BMP6*; *BMP7*; mRNA 表达

Relationship Between the *BMP2*, *BMP4*, *BMP6* and *BMP7* Gene Expression and Ovulation Number in Hu Sheep

XU Ye-fen^{1,2}, LI Qi-fa¹, LI Er-lin¹, TU Fei¹, HU Dong-li¹, XIE Zhuang¹, CHEN Ling³

(¹College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ²College of Animal Science and Technology, Tibet University, Linzhi 860000, Tibet; ³Suzhou Sheep Breeding Farm of Jiangsu Province, Suzhou 215000, Jiangsu)

Abstract: 【Objective】The present study was performed to investigate the relationships between the mRNA level of *BMP2*, *BMP4*, *BMP6* and *BMP7* gene in ovaries and the ovulation number in Hu sheep, so as to provide references for finding hyper-prolificacy candidate gene and understanding the molecular genetic mechanism of high fecundity in Hu sheep. 【Method】Sixteen adult Hu ewes, classified as the single lambing (S) or multiple lambing (M) group, were sacrificed for tissue sampling and ovulation number counting between 24-36h after estrus diagnosis. The tissue distributions of *BMP2*, *BMP4*, *BMP6* and *BMP7* mRNA were detected by RT-PCR and the gene expression levels in the ovaries were investigated by real-time PCR. 【Result】*BMP2*, *BMP4* and *BMP7* mRNA existed in the ovary and other tissues, including hypothalamus, pituitary, uterus, heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle and oviduct, but *BMP6* mRNA was only detected in the ovary, kidney, muscle and oviduct. The expression level of *BMP2*, *BMP6* and *BMP7* mRNA in the ovary did not differ between S and M group ($P > 0.05$), but *BMP4* mRNA abundance in the ovary was extremely higher in M group than that in S group ($P < 0.01$). Bivariate correlation analysis showed that *BMP4* mRNA expression in the ovary was positively correlated with ovulation number ($r = 0.741$, $P < 0.05$), but there was no correlation between the mRNA expression level of *BMP2*, *BMP6* or *BMP7* and the ovulation number ($P > 0.05$). 【Conclusion】The results suggested that *BMP4* might play a key role in ovulation number and might be a candidate gene for high fecundity in Hu sheep.

收稿日期: 2009-03-16; 接受日期: 2009-07-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671503)、江苏省自然科学基金资助项目 (BK2007156)

作者简介: 徐业芬 (1975—), 女, 湖北随州人, 博士研究生, 研究方向为动物分子遗传学。Tel: 025-84395046; Fax: 025-84395314; E-mail: xzlxxyf@163.com; 通信作者谢庄 (1947—), 男, 江苏无锡人, 教授, 研究方向为动物分子数量遗传学。Tel: 025-84395046; Fax: 025-84395314; E-mail: zxie@njau.edu.cn

Key words: hu sheep; ovulation number; *BMP2*; *BMP4*; *BMP6*; *BMP7*; mRNA expression

0 引言

【研究意义】湖羊在中国江苏、浙江和上海等南方地区的养羊业占有十分重要的地位，是世界著名的多胎绵羊品种之一，经过选育后其产羔率最高可达343.18%^[1]，开展湖羊高繁多胎遗传机理的研究对湖羊优良种质资源创新利用具有一定的理论意义和实践价值。【前人研究进展】自从发现骨形态发生蛋白 IB 型受体（bone morphogenetic protein receptor type IB, BMPRII）基因突变和 Booroola 绵羊多胎表型完全一致的特征后^[2]，骨形态发生蛋白（bone morphogenetic proteins, BMPs）在绵羊生殖方面的研究日益受到关注。BMPs 是转化生长因子 β （transforming growth factor β , TGF β ）超家族中最大的亚家族，为多功能蛋白，在卵巢中发挥旁/自分泌调节作用，调节卵泡发育^[3-4]。BMPs 通过细胞外配体作用于跨膜丝/苏氨酸激酶受体（BMP 受体）后，使 BMP II 型受体磷酸化 BMP I 型受体，活化的 I 型受体与信号转导蛋白 Smad 1 或 Smad 5 结合，磷酸化 Smad 1 或 Smad 5 蛋白质羧基端的丝氨酸，Smad 5 磷酸化后与 Smad 4 结合形成复合体转移到核内，作用于特定基因的启动子，引发生物学效应^[4-5]。在 BMP 亚家族中，绵羊 *BMP15* 基因不同的点突变杂合体具有较高的排卵数，为某些品种绵羊的主效基因。目前在湖羊上还未检测出 *FecX*^H、*FecX*^H、*FecX*^B、*FecX*^G 和 *FecX*^L 等已知突变位点^[6-9]。研究发现湖羊均为 *BMPRII* 基因 746 碱基处（A→G）突变纯合子，认为 *BMPRII* 基因并非湖羊多胎性能的主效基因^[6]。同时，未检测到湖羊与 Cambridge 和 Belclare 羊中发现的主效基因即 *GDF9* 基因类似的点突变^[8]。因此，不同绵羊品种间控制多胎性状的主效基因可能不尽相同，湖羊很可能存在其它未知主效基因。研究表明 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 是 BMPs 亚家族中重要成员，在小鼠、大鼠、鸡、牛、猪和绵羊卵泡中表达^[10-15]，可调节卵泡发育及卵泡细胞功能^[3,11-13,15-19]。【本研究切入点】从 mRNA 水平上研究 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因的表达水平与湖羊排卵数之间的关系，揭示湖羊高繁多胎机理和筛选影响湖羊多胎性状的特有候选基因的研究报道较少。

【拟解决的关键问题】本试验利用 RT-PCR 和荧光实时定量 PCR 技术，检测 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因在湖羊组织表达特征及其在产多羔和单羔湖羊卵

巢组织中的表达水平差异，与排卵数间的相关性进行分析，从分子水平上探讨这些基因 mRNA 表达水平与湖羊高繁殖力的关系，寻找湖羊多胎性状相关候选基因更丰富的遗传信息，进而筛选影响湖羊多胎的候选基因，为湖羊高繁殖力的早期选育和品系的培育提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物与样品采集

在江苏省湖羊种羊保种场选择健康无病、体况良好、经产湖羊母羊 16 只。所选湖羊连续多个世代均生活在该保种场内，种羊遗传背景基本一致。该保种场未受外来基因污染，遗传环境相对封闭。根据生产繁殖记录，将经产三羔、四羔母羊 8 只作为多羔组，经产单羔 8 只作为对照组。采样前用氯前列醇钠（Cloprostenol Sodium for Injection, PG-C，批号为 050903，宁波市激素制品有限公司生产）进行同期发情处理并记录各羊发情时间，18 d 后第二次自然发情时，采用阴道检查法和试情公羊（输精管结扎）试情法进行发情鉴定，发情后 24~36 h 内将试验羊称重后全部屠宰，取出子宫角及卵巢，记录卵巢的排卵点（或黄体数），即为排卵数。然后快速剥离卵巢后称重取样，同时分离下丘脑、垂体、卵巢、子宫、肝脏、肾脏、股二头肌等组织，放入液氮，-70℃ 保存，用于提取总 RNA。

1.2 总 RNA 提取和反转录

用 Trizol 提取法提取组织总 RNA，具体操作参照试剂盒（美国 Invitrogen 公司）说明书进行。紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度（OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.8~2.0）。用随机引物对总 RNA 进行反转录，反应体系为 25 μ l：2 μ g 总 RNA，1 μ g 随机引物，0.4 mmol·L⁻¹ dNTP，20U Rnasin，200U M-MLV 反转录酶（Promega 公司），5 μ l 5 \times RT Buffer（含 250 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.3，50 mmol·L⁻¹ MgCl₂，250 mmol·L⁻¹ KCl，50 mmol·L⁻¹ DTT，2.5 mmol·L⁻¹ Spermidine）。反应程序：先加 RNA 原液，dNTP 和随机引物，70℃ 变性 5 min 后立即放冰上冷却，再加其它试剂，混匀后 37℃ 反应 60 min，95℃ 灭活 5 min。RT 产物保存于 -20℃ 备用。

1.3 RT-PCR 反应与克隆测序

GenBank 检索到 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6*、*BMP7*

和 β -actin 参考序列信息, 用 Primer premier 5.0 软件设计引物 (表 1), 上海英骏生物技术有限公司合成。以持家基因 β -actin 作为内参。

反应体系为 10 μ l: 0.5 μ l RT 产物, 1U Taq DNA 聚合酶, 1 μ l 10 \times PCR Buffer (100 mmol \cdot L $^{-1}$ Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol \cdot L $^{-1}$ KCl), 0.25 mmol \cdot L $^{-1}$ dNTP, 1.25 mmol \cdot L $^{-1}$ MgCl $_2$, 0.5 μ mol \cdot L $^{-1}$ 上游和下游引物。反应

程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, PCR 循环, 94 $^{\circ}$ C 30s, 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 共 33~36 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶 (Acr : Bis = 29 : 1) 电泳分离, 银染后用凝胶成像系统 (美国 Bio-rad 公司) 照相。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下割取目的片段, 用 V-gene DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化。纯化的 PCR 产物送上海英骏生物技术

表 1 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6*、*BMP7* 和 β -actin 引物参数

Table 1 Parameters of oligo-nucleotide primer pairs for the *BMP2*, *BMP4*, *BMP6*, *BMP7* and β -actin

目的基因 Target genes	引物序列 Primer sequence	产物 Product size (bp)	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}$ C)	cDNA 参考序列 Reference sequence
<i>BMP2</i>	F:5'-ATCACCTGAACTCCACGAA-3'	140	48	DQ192012
	R: 5'-TACCACCTTCTCATTCTCATC-3'			
<i>BMP4</i>	F:5'-GGGGAAGAAAAAAGTCGCCGAGATT-3'	238	64.5	AF508312
	R:5'-CTCAGGATACTCCAGACCGATGCC-3'			
<i>BMP6</i>	F: 5'-GGTGGCAGGACTGGATCATT-3'	190	58	DQ192014
	R:5'-CACCGAGATGGCGTTCAGTT-3'			
<i>BMP7</i>	F:5'- AAAACAGCAGCAGCGACCAGAG-3'	123	68	AF508311
	R:5'- CCTCACAGTAGTAGCGGCATAGC-3'			
β -actin	F:5'-AGCCTTCCTCCTGGGCATGGA-3'	117	68	U39357
	R:5'-GGACAGCACCGTGTGGCGTAGA-3'			

有限公司做克隆测序。

1.4 荧光实时定量 PCR

反应体系为 20 μ l: 1 μ l RT 产物, 0.5 μ mol \cdot L $^{-1}$ 目的基因上游和下游引物, 10 μ l 2 \times SYBR $^{\circledR}$ premix Ex Taq $^{\text{TM}}$ (购自大连 TaKaRa 公司)。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; PCR 循环, 95 10 s, 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 读板, 共 48 个循环; 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 进行融解曲线分析: 65~94 $^{\circ}$ C, 每隔 0.2 $^{\circ}$ C 读板一次 (温度恒定 1 s 后读板)。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法获得结果, 其中 $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})$ 。每个个体各基因 mRNA 表达量值以卵巢样品分别测定 3 次后各基因 mRNA 表达量 (相对于 β -actin) 的平均值表示。

1.5 数据分析

SPSS13.0 软件包中的 Independent-samples T-Test 对湖羊体重、已产胎次、每胎平均产活羔数、排卵数和卵巢组织中各基因 mRNA 表达量在两组间的差异进行分析; 用 Bivariate Correlations 和 Linear regression 对湖羊卵巢组织中基因 mRNA 表达量与卵巢排卵数间分别进行简单相关和线性回归分析。数据表示为 $\bar{x} \pm Sd$ 。

2 结果与分析

2.1 单羔组与多羔组湖羊繁殖相关参数的比较

两组体重、已产胎次、每胎平均产活羔数和排卵数见表 2。从表 2 可以看出, 多羔组每胎平均产羔数和排卵数极显著高于单羔组 ($P < 0.01$), 湖羊体重和已产胎次在单羔组和多羔组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 2 单羔组、多羔组湖羊繁殖相关参数的比较

Table 2 Comparison of fecundity parameters in single lambling and multiple lambling Hu sheep

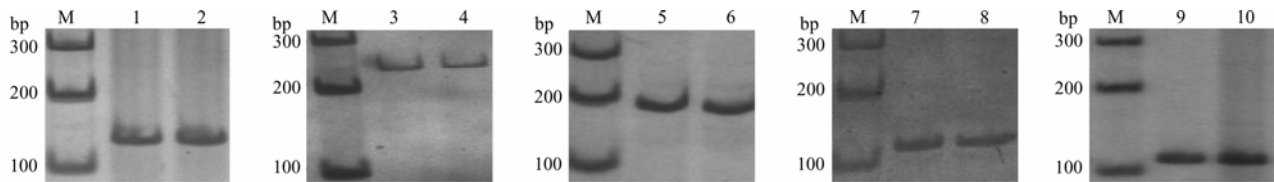
	单羔组 Single lambling (S)	多羔组 Multiple lambling (M)
样本量 Animal numbers	8	8
体重 Body weight (kg)	37.8 \pm 10.86	45.7 \pm 10.89
已产胎次(次) Birth order	2.33 \pm 0.58	2.60 \pm 0.55
每胎平均产活羔数(个) Average number of lambs	1.00 \pm 0.00	2.90 \pm 0.64**
排卵数(个) Ovulation number	2.00 \pm 0.00	3.80 \pm 0.84**

同列数据标*和**分别表示差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$) *and** in the same line indicate the difference ($P < 0.05$) and extreme difference ($P < 0.01$)

2.2 湖羊 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 RT-PCR 扩增结果及克隆测序

以湖羊组织总 RNA 混合物为模板, 用设计的 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6*、*BMP7* 和 β -*actin* 基因引物分别进行 RT-PCR 扩增 (图 1)。测序发现, 产物与预

期片段大小一致。用 DNAMAN5.2.2 对测序结果与引物设计源序列进行同源性比较, 发现湖羊 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6*、*BMP7* 和 β -*actin* 扩增片段与引物设计源序列同源性分别为 100%、99%、100%、100%和 100%; 表明 PCR 扩增片段分别为湖羊 *BMP2*、*BMP4*、



M: DNA 分子量标记 (100 bp ladder); 1, 2: 湖羊 *BMP2* 基因扩增片段; 3, 4: 湖羊 *BMP4* 基因扩增片段; 5, 6: 湖羊 *BMP6* 基因扩增片段; 7, 8: 湖羊 *BMP7* 基因扩增片段; 9, 10: 湖羊 β -*actin* 基因扩增片段
M: DNA molecular weight marker (100 bp ladder); 1, 2: Fragments amplified of *BMP2* in Hu sheep; 3, 4: Fragments amplified of *BMP4* in Hu sheep; 5, 6: Fragments amplified of *BMP6* in Hu sheep; 7, 8: Fragments amplified of *BMP7* in Hu sheep; 9, 10: Fragments amplified of β -*actin* in Hu sheep

图 1 湖羊 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6*、*BMP7* 和 β -*actin* 基因的 RT-PCR 电泳图

Fig. 1 RT-PCR of *BMP2*, *BMP4*, *BMP6*, *BMP7* and β -*actin* in Hu sheep

BMP6、*BMP7* 和 β -*actin* 基因 cDNA 片段。

2.3 湖羊 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因的组织表达谱分析

利用 RT-PCR 对湖羊下丘脑、垂体、子宫、卵巢、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和股二头肌组织中的 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因表达分别进行检测 (图 2)。*BMP2*、*BMP4* 和 *BMP7* 在成年湖羊发情后 24~36 h 内下丘脑、垂体、子宫、卵巢、心脏、肝

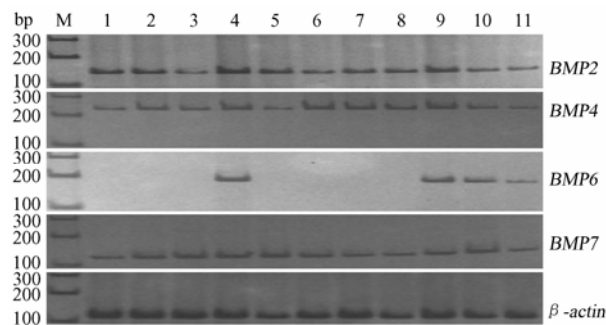
脏、脾脏、肺脏、肾脏和肌肉组织中均有表达, 而 *BMP6* 仅在卵巢、肾脏、肌肉和输卵管组织中有表达。

2.4 多、单羔组湖羊卵巢组织 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达水平差异

对经产单羔和多羔湖羊卵巢组织 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达水平进行了荧光定量检测 (图 3)。从图 3-B 可以看出产多羔组卵巢组织 *BMP4* 基因 mRNA 表达量 (0.568 ± 0.189) 极显著高于产单羔组 (0.130 ± 0.052) ($P < 0.01$); 但 *BMP2*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达量在产多羔组和产单羔组湖羊的卵巢组织中无显著差异 ($P > 0.05$) (图 3-A, C, D)。

2.5 湖羊卵巢组织 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因表达量与排卵数间的相关性及线性回归分析

湖羊 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达量与排卵数间的简单线性相关分析结果见表 3。从表中可以看出卵巢中只有 *BMP4* 基因 mRNA 表达量与排卵数呈显著正相关 ($r = 0.741$, $P < 0.05$)。在相关系数的基础上, 建立了湖羊卵巢 *BMP4* 基因 mRNA 表达量与排卵数的线性回归方程: $A = 1.90 + 3.03 \times B$ ($r^2 = 0.55$), 其中 A 为排卵数, B 为卵巢 *BMP4* mRNA 表达量。



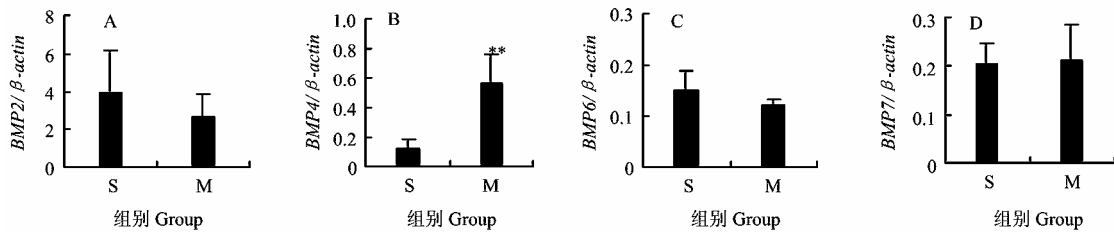
M: DNA 分子量标记 (100bp ladder); 1: 下丘脑; 2: 垂体; 3: 子宫; 4: 卵巢; 5: 心脏; 6: 肝脏; 7: 脾脏; 8: 肺脏; 9: 肾脏; 10: 肌肉; 11: 输卵管
M: DNA molecular weight marker (100 bp ladder); 1-11: Hypothalamus, pituitary, uterus, ovary, heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle and oviduct, respectively

图 2 湖羊 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因的组织表达谱

Fig. 2 The expression profile of *BMP2*, *BMP4*, *BMP6* and *BMP7* in Hu sheep

3 讨论

绵羊繁殖力高低直接关系到经济效益。随着分子



S: 产单羔组湖羊; M: 产多羔组湖羊; **表示产多羔组和产单羔组 *BMP4* 基因表达量差异极显著 ($P < 0.01$)

S: Single lambing group; M: Multiple lambing group. **denotes the difference of expression level between S and M Hu sheep is extremely remarkable ($P < 0.01$)

图 3 湖羊卵巢组织中 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 的表达水平

Fig. 3 *BMP2*, *BMP4*, *BMP6* and *BMP7* mRNA expression in ovaries of Hu sheep

表 3 湖羊卵巢 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达量与排卵数间的相关分析

Table 3 Correlation coefficients between *BMP2*, *BMP4*, *BMP6* and *BMP7* mRNA expression in ovaries and number of ovulation in Hu sheep

	基因 mRNA 表达量 Gene mRNA expression			
	<i>BMP2</i>	<i>BMP4</i>	<i>BMP6</i>	<i>BMP7</i>
排卵数 Number of ovulation	$r=-0.056$ $P=0.895$	$r=0.741^*$ $P=0.036$	$r=-0.377$ $P=0.357$	$r=-0.272$ $P=0.515$

* 表示显著相关 ($P < 0.05$) * Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

数量遗传学的发展,人们在分子水平对绵羊繁殖性状进行了广泛的遗传基础研究,试图发现并定位影响绵羊高繁性能的主效基因,以便开展高繁殖力分子育种改良。湖羊的研究主要集中于国外某些品种或品系上已经定位的 *BMP1B*、*BMP15* 和 *GDF9* 等主效基因相同的点突变位点检测,结果表明它们可能不是影响湖羊高繁多胎的主效基因^[6-9],目前还无法从根本上揭示湖羊高繁多胎遗传机理,从功能基因表达水平上对可能影响绵羊排卵数主要调控因子基因进行研究是揭示湖羊高繁多胎机理的有效途径之一。

研究发现 BMP 家族可广泛作用于卵巢生殖细胞(包括各级卵母细胞、颗粒细胞、卵泡及黄体),并通过旁/自分泌对卵泡发育进行调节^[4]。本试验结果显示 BMP 家族基因中 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因在湖羊卵巢组织均有表达,这与猪、鼠、鸡和牛等其它物种的研究结果一致^[10-15],说明 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因在湖羊发情后 24~36 h 内的卵巢组织中可能发挥重要作用。有研究表明, *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 蛋白可抑制绵羊颗粒细胞孕酮分泌^[15,19],但不影响绵羊颗粒细胞增殖和存活^[15], *BMP2* 和 *BMP6* 蛋白可抑制猪卵泡膜细胞孕酮和雄激素的合成, *BMP2* 蛋白可单独抑制卵泡膜细胞雌二醇的合成,而 *BMP6* 蛋白可单独促进卵泡膜细胞增殖^[18],

BMP4 蛋白可以促进小鼠原始卵泡发育为初级卵泡^[16], *BMP7* 蛋白可致大鼠原始卵泡数降低,初级、腔前和有腔数增加^[20]。对基因表达的研究发现: Romney 绵羊非闭锁卵泡卵母细胞仅表达 *BMP6* mRNA 而不表达 *BMP2*、*BMP4*、*BMP7*,但 RT-PCR 可以检测出颗粒细胞 *BMP2*、*BMP4* 和 *BMP7* mRNA 表达^[15];猪卵丘卵母细胞复合体在体外成熟培养过程中, *BMP6* 基因表达在卵母细胞中下调,而 *BMP4* 基因表达保持不变,在卵丘细胞中 *BMP4* mRNA 显著升高,而 *BMP6* mRNA 下调^[21]。在彩虹鲑鱼上发现排卵前卵巢 *BMP4* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达增长^[22]。本试验发现湖羊发情后 24~36 h 卵巢组织中 *BMP2*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达在产单羔组和多羔组间无显著差异,但多羔组湖羊 *BMP4* 基因 mRNA 表达显著高于单羔组,相关和回归分析表明只有 *BMP4* 基因 mRNA 表达量与排卵数呈正相关。说明 *BMP4* 基因表达量可能是影响湖羊排卵数的因素之一,可能是 BMP 系统调节湖羊多胎性状、卵泡成熟和排卵的一个关键节点,是影响湖羊排卵数的候选基因,其调控机理还有待于进一步研究。

本试验组织表达谱发现, *BMP2*、*BMP4* 和 *BMP7* 基因在湖羊下丘脑、垂体、子宫、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、骨二头肌等组织内也有表达,而 *BMP6*

基因在肾脏、肌肉、输卵管组织中有表达。其中在垂体组织中的表达与 Faure 等^[23]结果相一致,说明它们在垂体组织可能对湖羊繁殖功能产生影响。已证明 BMP2 蛋白可在成年小鼠垂体组织表达,并与 activin A 共同促进 FSH β 转录^[24], BMP4 蛋白可抑制绵羊垂体细胞 FSH β mRNA 表达和 FSH 释放^[23], BMP4 蛋白与 activin 和 GnRH 一起可促进小鼠垂体细胞 FSH β mRNA 表达和 FSH 释放^[25],目前 BMP2、BMP4 和 BMP7 基因在湖羊垂体内的具体作用还不明确。

4 结 论

本试验对成年发情后 24~36 h 湖羊母羊 BMP2、BMP4、BMP6 和 BMP7 基因组织表达谱进行了研究,发现 4 个基因在卵巢组织均有表达, BMP2、BMP4 和 BMP7 基因在垂体及下丘脑、子宫、输卵管、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉组织中表达, BMP6 在肾脏、肌肉、输卵管组织中表达。在卵巢组织中,湖羊多羔组与单羔组排卵数差异显著, BMP2、BMP6 和 BMP7 基因 mRNA 表达在单羔组和多羔组间无显著差异。多羔组湖羊 BMP4 基因 mRNA 表达极显著高于单羔组,相关和回归分析表明 BMP4 基因 mRNA 表达与排卵数呈正相关。因此, BMP4 可能对湖羊排卵数起作用,可作为影响湖羊排卵数的候选基因进一步研究。

References

- [1] 王元兴, 闫玉琴, 程瑞禾, 王 诚, 王曙雁, 沈补根, 吴建信. 湖羊繁殖力单项选育效果. 当代畜牧, 2000, 4(4): 31-32.
Wang Y X, Yan Y Q, Cheng R H, Wang S Y, Shen B G. Effects of single fecundity selection in Hu sheep. *Contemporary Animal Husbandry*, 2000, 4(4): 31-32. (in Chinese)
- [2] Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, Cribiu E, Thimonier J, Teyssier J, Bodin L, Cognie Y, Chitour N, Elsen J M. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98: 5104-5109.
- [3] Shimasaki S, Zachow R J, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang R J, Erickson G F. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 7282-7287.
- [4] Knight P G, Glistler C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 2006, 132(2): 191-206.
- [5] Kaivo-oja N, Jeffery L A, Ritvos O, Mottershead D G. Smad signalling in the ovary. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2006, 21(4): 1-13.
- [6] 管 峰, 艾君涛, 刘守仁, 石国庆, 程瑞禾, 杨利国. BMPR-IB 和 BMP15 基因作为湖羊多胎性候选基因的研究. 家畜生态学报, 2005, 26(3): 9-12.
Guan F, Ai J T, Liu S R, Shi G Q, Cheng R H, Yang L G. Study of BMPR-IB and BMP15 as candidate genes for prolificacy in Hu sheep. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2005, 26(3): 9-12. (in Chinese)
- [7] 储明星, 孙 洁, 陈宏权, 方 丽. 绵羊 BMP15 基因 FecXL 突变的检测. 中国农学通报, 2007, 23(10): 85-88.
Chu M X, Sun J, Chen H Q, Fang L. Detection of the FecXL~L mutation of BMP15 gene in sheep. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(10): 85-88. (in Chinese)
- [8] 储明星, 桑林华, 王金玉, 方 丽, 叶素成. 小尾寒羊高繁殖力候选基因 BMP15 和 GDF9 的研究. 遗传学报, 2005, 32(1): 38-45.
Chu M X, Sang L H, Wang J Y, Fang L, Ye S C. Study on BMP15 and GDF9 as candidate genes for prolificacy of small tail Han sheep. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(1): 38-45. (in Chinese)
- [9] 储明星, 成 荣, 陈国宏, 方 丽, 叶素成. 小尾寒羊和湖羊高繁殖力候选基因 BMP15 的研究. 安徽农业大学学报, 2005, 32: 278-282.
Chu M X, Cheng R, Chen G H, Fang L, Ye S C. Study on bone morphogenetic protein 15 as a candidate gene for prolificacy of small tail Han sheep and Hu sheep. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2005, 32: 278-282. (in Chinese)
- [10] Erickson G F, Shimasaki S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003, 1(9): 9-19.
- [11] Onagbesan O M, Bruggeman V, Van As P, Tona K, Williams J, Decuyper E. BMPs and BMPRs in chicken ovary and effects of BMP-4 and -7 on granulosa cell proliferation and progesterone production in vitro. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2003, 285: 973-983.
- [12] Glistler C, Kemp C F, Knight P G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction*, 2004, 127: 239-254.
- [13] Fatehi A N, van den Hurk R, Colenbrander B, Daemen A J, van Tol H T, Monteiro R M, Roelen B A, Bevers M M. Expression of bone

- morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*, 2005, 63: 872-889.
- [14] Shimizu T, Yokoo M, Miyake Y, Sasada H, Sato E. Differential expression of bone morphogenetic protein 4-6 (BMP-4, -5, and -6) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) during ovarian development in neonatal pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 2004, 27: 397-405.
- [15] Juengel J L, Reader K L, Bibby A H, Lun S, Ross I, Haydon L J, McNatty K P. The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. *Reproduction*, 2006, 131: 501-513.
- [16] Tanwar P S, O'Shea T, McFarlane J R. In vivo evidence of role of bone morphogenetic protein-4 in the mouse ovary. *Animal Reproduction Science*, 2008, 106(3-4): 232-240.
- [17] Al-Musawi S L, Gladwell R T, Knight P G. Bone morphogenetic protein-6 enhances gonadotrophin-dependent progesterone and inhibin secretion and expression of mRNA transcripts encoding gonadotrophin receptors and inhibin/activin subunits in chicken granulosa cells. *Reproduction*, 2007, 134: 293-306.
- [18] Brankin V, Quinn R L, Webb R, Hunter M G. BMP-2 and -6 modulate porcine theca cell function alone and co-cultured with granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 2005, 29: 593-604.
- [19] Pierre A, Pisselet C, Dupont J, Mandon-Pepin B, Monniaux D, Monget P, Fabre S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004, 33: 805-817.
- [20] Lee W S, Otsuka F, Moore R K, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biology of Reproduction*, 2001, 65: 994-999.
- [21] Zhu G, Guo B, Pan D, Mu Y, Feng S. Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Animal Reproduction Science*, 2008, 104(2-4): 275-283.
- [22] Bobe J, Nguyen T, Jalabert B. Targeted gene expression profiling in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary during maturational competence acquisition and oocyte maturation. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(1): 73-82.
- [23] Faure M O, Nicol L, Fabre S, Fontaine J, Mohoric N, McNeilly A, Taragnat C. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *Journal of Endocrinology*, 2005, 186(1): 109-121.
- [24] Lee K B, Khivansara V, Santos M M, Lamba P, Yuen T, Sealfon S C, Bernard D J. Bone morphogenetic protein 2 and activin A synergistically stimulate follicle-stimulating hormone {beta} subunit transcription. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2007, 38: 315-330.
- [25] Nicol L, Faure M O, McNeilly J R, Fontaine J, Taragnat C, McNeilly A S. Bone morphogenetic protein-4 interacts with activin and GnRH to modulate gonadotrophin secretion in L{beta}T2 gonadotrophs. *Journal of Endocrinology*, 2008, 196: 497-507.

(责任编辑 高 雨, 林鉴非)