

BMP15 对卵巢功能的调节及对生殖的影响

董传河 杜立新*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 国家畜禽分子遗传育种中心 北京 100094;
山东省农业管理干部学院 济南 250100)

摘要:综述了 BMP15 在哺乳动物生殖系统中的表达和生物学作用,提示 BMP15 在垂体中表达并促进 FSH 的合成。在卵巢中由卵母细胞特异性分泌,促进颗粒细胞增殖并抑制 FSH 依赖性细胞分化。在一些物种中 BMP15 的变异会造成多胎或者不育,显示 BMP15 是影响哺乳动物生殖的重要因子。建议继续探讨 BMP15 的作用机理,同时研究其在其他物种中的变异对生殖的影响。

关键词: BMP15; 哺乳动物; 多胎; 不育

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)04-140-06

The Regulation of BMP15 on Ovarian Functions and Reproduction

DONG Chuan-He DU Li-Xin*

(*National Center for Molecular Genetics and Animal Breeding, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094; Shandong Agricultural Administrators' College, Jinan 250100, China*)

Abstract: In this paper, expression and biological function of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) in mammalian reproductive system are summarized. BMP15 is expressed in the pituitary and promotes the synthesis of FSH. Secreted specifically by oocytes, it promotes the generation of granular cell and inhibits the differentiation of FSH-dependent cells. Mutations of BMP15 may cause multiplets or sterility in some species, indicating that BMP15 is an important factor regulating animal reproduction. It is necessary to investigate the mechanisms of BMP15 functions and the effect of mutations on reproduction in other species.

Key words: BMP15; Mammals; Multiplets; Sterility

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 首次由 Urist 在 1965 年报道,在脱矿物质的骨组织和骨提取物中有一种活性成分,能够在异位诱导骨形成^[1]。1988 年由 Wozney 报道首次分离到 BMP15 并成功克隆全长 cDNA^[2]。从氨基酸的序列看,除 BMP1 是一种蛋白酶外,其余的 BMPs 都属于转移生长因子 (transforming growth factor, TGF) 超家族成员。BMPs 除了诱导骨形成外,在多种组织中调节生长、发育和细胞凋亡,越来越多的研究表明 BMPs 在生殖调节中发挥着重要的作用。

BMPs 是 TGF 超家族中最大的一类生长因子,大多数 BMPs 的氨基酸序列中有 7 个保守

的半胱氨酸残基,通过形成一个二硫键连接两个亚基,形成具有生物活性的二聚体。重组蛋白表达研究表明, BMP-2, -4, -5, -6, -7 能形成异二聚体,而且异二聚体的生物活性超过同二聚体。BMP15 与生长分化因子 9 (growth differentiation factor-9, GDF9) 缺少形成二硫键所必须的第四个半胱氨酸残基,它们是形成非共价键的二聚体,而且共表达时还可形成异二聚体^[3]。

基金项目 山东省自然科学基金项目 (No. Y2006D24);

*通讯作者, E-mail: lxdu@263.net;

第一作者介绍 董传河,男,教授,博士研究生;研究方向:动物分子育种; E-mail: dch0007@163.com。

收稿日期:2007-12-09,修回日期:2008-03-11

BMP15 是一种在卵巢表达的卵母细胞衍生因子,在正常情况下主要与卵巢自身产生的 GDF9 协调作用于卵泡,以自分泌或旁分泌形式影响优势卵泡的发育及卵母细胞的生长。另外,在某些物种的垂体与睾丸中也发现 GDF9 和 BMP15 少量 mRNA 的表达,表明这些生长因子在调节哺乳动物生殖方面可能起着多重的调节作用。

1 BMP15 在脑垂体中的表达和生物学作用

大量研究表明,成年哺乳动物脑垂体组织表达 BMPs 及其受体,例如, BMP-6、-7、-15 mRNAs 在 小 鼠 (*Mus musculus*), GDF-9 mRNA 在 人 (*Homo sapiens*), BMP-15、GDF-9 mRNAs 在 刷 尾 负 鼠 (*Trichosurus vulpecula*), BMP-15 mRNA 在 绵 羊 (*Ovis aries*) 均有表达。受体 BMPR-、ActR-、ALK2、ALK3 mRNAs 在 小 鼠 表 达, ALK6 mRNA 在 绵 羊, ActR-、ActR- B mRNAs 在 大 鼠 (*Rattus norvegicus*) 表达^[3]。BMP-6、-7、-15 还可直接作用于脑垂体调节 FSH 的合成和分泌, Otsuka^[4] 报道 BMP-15 在促性腺系细胞 L T2 和小鼠垂体组织中表达。BMP15 在 L T2 细胞中促进 FSH 亚基的转录,但对 LH 以及 GnRH 受体的转录没有影响。提示在垂体组织 BMP15 通过自分泌调控作用有选择地促进促卵泡素 (FSH) 的合成。FSH 的合成是在垂体组织中形成 / 异二聚体, 亚基的合成是 FSH 合成的关键。FSH 是调控母畜发情、排卵的一种重要激素, BMP15 在垂体中表达, 并促进 FSH 的合成, 提示 BMP15 对哺乳动物生殖的调控不仅是作用于卵巢, 而且作用于分泌促性腺激素的脑垂体, 其具体的机理和对生殖的影响有待于进一步的研究。

2 BMP15 在卵巢中的表达特征和生物学作用

2.1 BMP15 在卵巢中的表达特征 BMPs 在卵巢的表达有种间差异, 到目前为止, BMP-2、-3、-3B、-4、-6、-7、-15 和 GDF9 的表达比较清楚^[5]

(图 1)。BMP-2 在颗粒细胞表达, BMP-4、-7 在膜细胞和间质细胞表达, BMP-6、-15、GDF9 在卵母细胞中特异性表达。BMP15 在卵母细胞表达的特异性更强, 在小鼠、大鼠和人的卵巢中, BMP15 只在卵母细胞中强烈表达^[6]。在小鼠的试验中, 卵母细胞中 BMP15 的 RNA 从初级卵泡阶段开始表达, 并伴随卵泡的发育而增强。在大鼠的试验中, 从初级卵泡一直到排卵前的成熟卵泡, 在卵母细胞中同时检出 BMP15 的 RNA 和蛋白质。在猪 (*Sus scrofa*) 的卵母细胞体外培养试验中, GDF9 在未成熟卵母细胞中强烈表达并随着卵母细胞的成熟而下调。BMP15 mRNA 及蛋白质在未成熟卵母细胞中表达水平较低, 但随着卵母细胞的成熟而增强, 并在体外成熟的第 18 h 达最大表达量, 与卵丘细胞的扩散时间吻合^[7]。

卵母细胞 Oocyte 颗粒细胞 Granulose cells 膜细胞 Theca cells

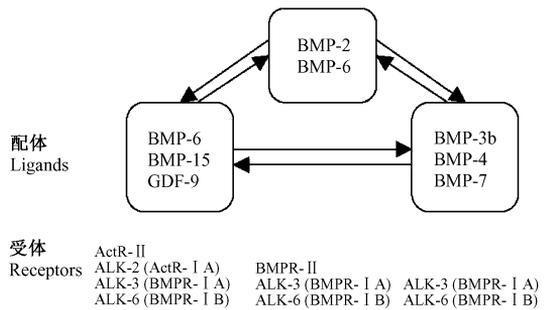


图 1 BMPs 配体和受体在卵巢中的表达分布 (仿大塚文男^[5])

Fig.1 Summary of the BMP system in the ovarian follicle (Modified from Otsuka^[5])

在卵巢中发现了 BMP I 型受体 (BMPRI A 和 BMPRI B) 及 II 型受体 (BMPR II)^[8], 在大鼠的卵巢中, BMPRI A (ALK3) 分布在卵母细胞和颗粒细胞, 特别是在卵母细胞中强烈表达。BMPRI B (ALK6) 则分布在卵母细胞和初级卵泡以后的颗粒细胞中。另一方面, BMPR II 的表达几乎全部局限在颗粒细胞中, 从次级卵泡的最初阶段开始强列表达。在山羊 (*Capra hircus*) 的卵巢中, 所有的 BMPs 受体都在从初级卵泡到成熟卵泡的颗粒细胞中表达, 并且一部分也在卵母细胞、膜细胞及黄体中表达。存在

于卵巢中的 BMPs 配体和受体形成了细胞间的通讯,共同影响卵母细胞的发育及卵泡的发育。

2.2 BMP15 在卵巢中的信号传导 关于 BMP15 的信号传导,已经明确是 BMP15 和颗粒细胞上的 BMPRII (ALK-6) 以及 BMPRI 型受体相结合引起 Smad1、5、8 的磷酸化(图 2)。但由 BMP15 促进的颗粒细胞的增殖作用可受 MAPK

(ERK) 信号通路的阻止而受抑制,可以认为 BMP15 在颗粒细胞中的生理活性除了与 Smad 信号通路有关外,还与 MAPK 的活化有关系。从 ERK 的阻断不影响 BMP15 对 FSH 的抑制作用来看,在颗粒细胞的有丝分裂和固醇类合成过程中,BMP15 有可能激活不同的信号传导通路^[9]。

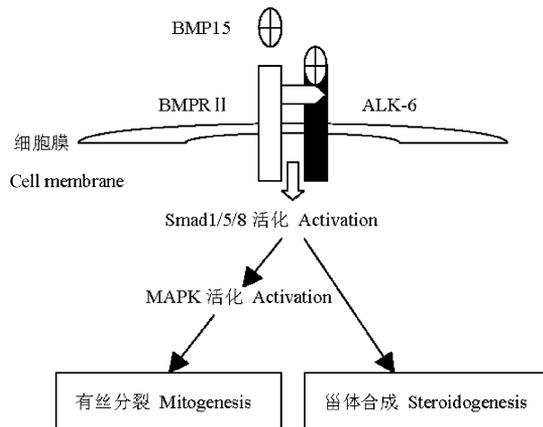


图 2 BMP15 信号传导通路(仿大塚文男^[5])

Fig. 2 BMP15 signaling pathway (Modified from Otsuka^[5])

2.3 BMP15 在卵巢中的生物学作用

2.3.1 BMP15 能够刺激腔前卵泡颗粒细胞的有丝分裂和细胞增殖 卵泡发育可分为两个明显的阶段,促性腺激素不依赖阶段(腔前卵泡)和促性腺激素依赖阶段(有腔卵泡)。在不依赖促性腺激素的腔前卵泡,主要由局部产生的生长因子促进卵泡的发育,其中 BMP15 能够刺激腔前卵泡颗粒细胞的有丝分裂和细胞增殖。对新生小鼠和出生 4 d、8 d 小鼠的卵巢切片进行原位杂交,发现刚出生时原始卵泡中的卵母细胞无 BMP15 的表达,GDF9 mRNA 的表达量也极其微量。在第 4 d 的卵母细胞中均可检测到二者的表达,在第 8 d 二者大量表达^[10]。在绵羊的初级卵泡向次级卵泡转换的阶段,BMP15 发挥重要作用,发生 BMP15 突变的纯合体的 Inverdale 羊和 Hanna 羊,卵泡发育停滞。但 BMP15 失活的小鼠生育力改变不大^[11],说明 BMP15 的作用具有种间差异。

2.3.2 BMP15 和 KL 共同调节颗粒细胞的增殖

和卵母细胞的发育 在体内卵泡发育早期阶段,kit ligand (KL) 由颗粒细胞高度表达。c-kit 受体和 kit 配体在卵泡发育过程中起重要作用,由颗粒细胞产生的 kit 配体,可诱导卵母细胞生长和膜细胞增生^[12]。自然发生 KL 突变的雌性小鼠由于卵子发育和卵泡发育异常而不育,在卵母细胞 c-kit 受体发生突变的雌性小鼠也造成不育,证明 KL 体系在雌性生殖中的生物学重要性。BMP15 在大鼠颗粒细胞中刺激 KL 的表达,在颗粒细胞、卵母细胞共培养体系中添加 KL,BMP15 的表达显著地减少。卵母细胞衍生的 BMP15 和颗粒细胞衍生的 KL 构成一个异常的“配子体细胞负反馈圈(negative feedback loop)”,共同调控颗粒细胞的有丝分裂和细胞增殖,同时影响卵母细胞本身的发育^[13](图 3)。

2.3.3 BMP15 全面抑制 FSH 的作用 BMP15 通过抑制 FSH 受体的表达,明显抑制 FSH 诱导的甾体激素合成快速调节蛋白、P450 侧链裂解酶、3-羟类固醇脱氢酶、促黄体生成素受体、抑

制素/激活素亚单位 mRNA 的表达。但 BMP15 不抑制由血小板凝集抑制剂诱导的以上各因子 mRNA 的表达,说明 BMP15 的作用位点在 cAMP 信号的上游。BMP15 抑制 FSH 诱导的甾体激素合成快速调节蛋白、P450 侧链裂解酶的表达和孕激素的合成,证明 BMP15 与 BMP-4、-6、-7, 以及 GDF-9 一样,也是黄体素化抑制物 (luteinization inhibitor)。排卵前由于黄体素化抑

制物的存在,不会发生黄体化,排卵后由于卵母细胞的释放使黄体素化抑制物降低,从而引起黄体生成。BMP15 抑制 FSH 诱导的类固醇合成及基因表达与 BMP-6 十分类似,但其作用机制不同,BMP-6 通过抑制腺苷酸环化酶活性来抑制 FSH 信号传导,而 BMP-15 是通过抑制 FSH 受体表达来抑制 FSH 信号传导^[14]。

2.3.4 BMP15与卵巢激素相互作用影响卵泡

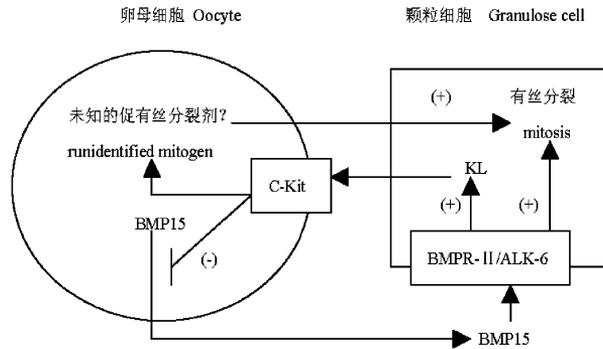


图3 BMP15 与 KL 共同调节颗粒细胞的有丝分裂(仿 Shimasaki 等^[3])

Fig.3 Interaction between BMP-15 and KL in the regulation of granulosa cell mitosis

(Modified from Shimasaki et al^[3])

发育 BMP15 抑制依靠 FSH 的孕酮的产生,但对雌激素的产生没有影响,从而使一些动物在卵泡期表现发情症状。在体外细胞培养试验中,雄烯二酮作为 P450 芳香化酶的底物,在缺乏雄烯二酮的条件下,BMP15 可抑制 FSH 促进 P450 芳香化酶表达的作用。但在体内的优势卵泡中,卵泡液中充满了雄烯二酮,BMP15 不能抑制 FSH 促进雌激素合成的作用。卵泡抑素可以抑制 BMP15 的作用^[15],二者具有较高的亲和性。在卵泡发育的早期阶段 BMP15 抑制 FSH 的作用,但在优势卵泡中,卵泡抑素大量的表达,中和了 BMP15 抑制颗粒细胞中 FSH 受体表达的作用,使 FSH 在卵泡后期发育中发挥重要作用。另外,卵泡抑素可以抑制垂体分泌 FSH^[16],说明卵泡抑素对 FSH 起着双重的调节作用。

卵数和生殖力也有很大差异。从排卵数的遗传模式,许多多胎品种被鉴定在 BMP15 基因 (5 个)和 GDF9 基因 (1 个)存在突变。与野生型相比其杂合子表现为高排卵数,但其纯合体则由于卵泡发育受阻而表现为不育。

3 BMP15 基因突变对哺乳动物生殖作用的影响

绵羊有 900 多个品种,其生物特征不同,排

*FecX*¹ 基因是在新西兰罗姆尼多胎品系 Inverdale 羊群中发现的影响排卵数的一个主效基因,*FecX*^H 基因是在另一种罗姆尼羊多胎家系 Hanna 绵羊中发现的,这两个多胎基因都与 X 染色体连锁遗传^[17]。在这两个品种中都表现为纯合体不育而杂合体高产的现象。其遗传基因的本质都是 BMP15,对于 *FecX*^H 基因携带者来说,在该基因编码区多肽第 67 位核苷酸发生了 C T 的颠换,从而引入一个提前终止密码子。在 *FecX*¹ 中则是在这一基因高度保守编码区蛋白区第 92 位核苷酸发生了 T A 的颠换,导致第 31 位缬氨酸替换成天冬氨酸,氨基酸的改变使 BMP15 丧失了形成二聚体的能力。无论哪一种变异都会影响到 BMP15 的活性,在

纯合体中由于 BMP15 活性的完全丧失, *KL/c-kit* 的活化被中断, 颗粒细胞的增殖停止, 结果导致不孕。另一方面, 在杂合体中由于 BMP15 活性的降低, 使颗粒细胞中 FSH 受体抑制不完全, 发育早期的卵泡没有经过充分的选择和成熟, 就产生了排卵, 结果导致多胎。在具有 Inverdale 变异的 BMP15 和正常的 *GDF9* 共表达的 HEK293 细胞中 *GDF9* 成熟蛋白的正常加工处理发生障碍^[18], 可能 *GDF9* 的分泌下降也是纯合体不育的原因之一。具有 BMP15 另一变异 (*FecX^B*) 的 Belclare 和 Cambridge 羊也表现为纯合不育, 发现是由于 BMP15 成熟蛋白的氨基酸置换 (S99I), 使得 BMP15 和 *GDF9* 两者的成熟蛋白分泌受到抑制^[19]。

在高促性腺激素性卵巢机能不全的意大利姐妹的病例中也发现了 BMP15 变异纯合子的存在。在这一变异中, 由于 BMP15 前蛋白部位的氨基酸置换 (Y235C), 导致 BMP15 成熟蛋白加工异常, 影响到 BMP15 调控细胞增殖的作用^[20]。Chand 等在卵巢功能早衰症 (premature ovarian failure, POF) 患者中发现 BMP15 存在三个突变位点, 两个位于 5 端非翻译区 (31T G、71C G), 另一个位点在第一外显子 (387G A)^[21]。Laissue 等在 POF 患者检测到 BMP15 基因 (L148P) 和 *GDF9* 基因 (S186Y) 的突变杂合体, 这两个位点在脊椎动物高度保守, 提出这两个基因的突变虽然不是卵巢功能早衰症的主要原因, 但可能涉及 POF^[22]。这些发现显示人类原发性卵巢机能低下以及促性腺激素分泌异常与 BMP15 机能异常相关, 具有重要的生物学意义。

4 结 语

在雌性动物的生殖活动中, 下丘脑-垂体-性腺轴的内分泌调节起着关键作用, 其中 FSH 受下丘脑分泌的神经激素调节, 由垂体合成并分泌, 主要在卵巢调节卵母细胞的生长发育以及卵泡的发育和排卵。BMP15 在垂体表达并调节 FSH 的合成, 在卵巢上的卵母细胞中特异性表达, 可调节 FSH 受体的表达, 表明 BMP15 在

哺乳动物的生殖系统的内分泌调节中发挥着多重调节作用。一些物种 BMP15 的突变会引起不育或者多胎, 证明了 BMP15 在哺乳动物生殖中的作用, 也提示可能通过控制 BMP15 基因的表达来控制哺乳动物的生殖活动。今后一方面要继续探明 BMP15 在垂体和卵巢的表达模式以及对生殖活动的作用机理, 另一方面应继续开展对其他物种的 BMP15 的研究, 发现新的突变位点, 为建立家畜多胎分子标记和进行人类不育的健康诊断提供理论依据, 并期待开发 BMP15 的基因产品用于人类的疾病治疗及家畜的繁殖控制技术。

参 考 文 献

- [1] Urist M R. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965, **150**: 893 ~ 899.
- [2] Wozney J M, Rosen V, Celeste A J, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 1988, **242**: 1 528 ~ 1 534.
- [3] Shimasaki S, Moore R K, Otsuka F, et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, 2004, **25**(1): 72 ~ 101.
- [4] Fumio O, Shunichi S. A novel function of bone morphogenetic protein 15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology*, 2002, **143**(12): 4 938 ~ 4 941.
- [5] 大塚文男. 学術奨励賞受賞論文生殖内分泌学への新たな重要因子: BMP-15. 日本生殖内分泌学会奨励, 2004, **9**: 39 ~ 43.
- [6] Otsuka F, Yao Z, Lee T H, et al. Bone morphogenetic protein 15: Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem*, 2000, **275**(50): 39 523 ~ 39 528.
- [7] Li H K, Kuo T Y, Yang H S, et al. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Anim Reprod Sci*, 2008, **103**(3-4): 312 ~ 322.
- [8] Shimasaki S, Zachow R J, Li D, et al. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *PNAS*, 1999, **96**(13): 7 282 ~ 7 287.
- [9] Moore R K, Otsuka F, Shimasaki S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem*, 2003, **278**(1): 304 ~ 310.
- [10] Yan C, Wang P, DeMayo J, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*, 2001, **15**: 854 ~ 866.

- [11] Zeng F, Schultz R M. Gene expression in mouse oocytes and preimplantation embryos: use of suppression subtractive hybridization to identify oocyte- and embryo-specific genes. *Biol Reprod*, 2003, **68**(1) : 31 ~ 39.
- [12] Parrott J A, Skinner M K. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol Reprod Dev*, 2000, **55**(1) : 55 ~ 64.
- [13] Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *PNAS*, 2002, **99**(12) : 8 060 ~ 8 065.
- [14] Otsuka F, Yamamoto S, Erickson G F, et al. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem*, 2001, **276**(14) : 11 387 ~ 11 392.
- [15] Otsuka F, Moore R K, Iemura S I, et al. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **289**: 961 ~ 966.
- [16] Ueno N, Ling N, Ying S, et al. Isolation and partial characterization of follistatin: a novel Mr 35,000 monomeric protein which inhibits the release of follicle stimulating hormone. *PNAS*, 1987, **84**: 8 282 ~ 8 286.
- [17] Galloway S M, McNatty K P, Cambridge L M, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*, 2000, **25**(3) : 279 ~ 283.
- [18] Liao W X, Moore R K, Otsuka F, et al. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *J Biol Chem*, 2003, **278**(6) : 3 713 ~ 3 719.
- [19] Liao W X, Moore R K, Shimasaki S. Functional and molecular characterization of naturally occurring mutations in the oocyte-secreted factors bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9. *J Biol Chem*, 2004, **279**(17) : 17 391 ~ 17 396.
- [20] Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet*, 2004, **75**(1) : 106 ~ 111.
- [21] Chand A L, Ponnampalam A P, Harris S E, et al. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 2006, **86**(4) : 1 009 ~ 1 012.
- [22] Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*, 2006, **154**(5) : 739 ~ 744.

欢迎订阅《动物学杂志》

《动物学杂志》是中国科学院动物研究所、中国动物学会主办的科技期刊,亦是中國自然科学核心期刊。主要报道动物学领域的最新研究成果,介绍有创见的新思想、新学说、新技术、新方法。报道范围既有宏观生态研究,又有微观实验技术。报道层次既有科学前沿性、资料性的,也有技术性、知识性的。稿件内容涉及范围广,实用性强,主要栏目有:研究报告、珍稀濒危动物、技术与方法、研究简报和快讯、科技动态等等。读者对象为动物科学领域的研究、教学、技术、管理人员及广大业余爱好者。

近年,《动物学杂志》各项统计指标有了很大的提高,是国内各大数据库及国外著名数据库英国《动物学记录》、美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》收录的源期刊。

《动物学杂志》双月刊,16开,112页,2009年每册定价35元,全年210元,国内外公开发行。国内邮发代号:2-422;国外发行代号(Code No.):BM58。全国各地邮局均可订阅。如未能在当地邮局订到,可与编辑部直接联系。本刊对在校学生及个人订户7折优惠(直接与编辑部联系订阅)。

地址:北京市朝阳区大屯路 中国科学院动物研究所内《动物学杂志》编辑部;邮编:100101。

电话:(010)64807162;E-mail:journal@ioz.ac.cn。网址:bird.chinajournal.net.cn;dwxxz.ioz.ac.cn。

欢迎投稿、欢迎订阅、欢迎刊登广告。