

# 骨形态发生蛋白 7 在兔卵巢中的表达分析

李霖, 尹萍, 季金强, 冢桐

(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

[摘要] 为探讨 BMP7 蛋白在卵泡发育、黄体化和排卵过程中的作用, 本研究采用免疫组织化学方法检测了 BMP7 在兔卵巢中的表达定位情况。结果显示, BMP7 蛋白在兔卵巢原始卵泡和初级卵泡中未检测到表达; 在次级卵泡卵母细胞及有腔卵泡的各种细胞中都有表达, 但只在部分内膜细胞中表达; 在间质细胞、黄体及表面上皮中也有表达。由此表明, BMP7 没有参与兔原始卵泡的激活, 而在初级/次级卵泡转化以及其后的卵泡成熟过程中发挥了作用; BMP7 不仅是卵泡内膜细胞分泌因子, 而且也是卵母细胞和颗粒细胞分泌因子。对 BMP7 的表达来说卵泡内膜细胞存在功能性差异, BMP7 可能参与了兔黄体、排卵等活动的调节。

[关键词] 兔, 骨形态发生蛋白 7, 卵巢, 免疫组织化学

[中图分类号] Q344+.13; Q959.836 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)04-0094-04

## Expression and Discussion of Bone Morphogenetic Protein 7 in the Rabbit Ovary

Li Lin, Yin Ping, Ji Jinqiang, Ding Jiatong

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract** To discuss the actions of bone morphogenetic protein 7 (BMP7) in the process of follicular development, luteinization and ovulation, we examined the localization of BMP7 protein in the rabbit ovary using immunohistochemical method. The results showed that BMP7 protein was not expressed in primordial or primary follicles. Instead, it was found in both oocytes of secondary follicles and all cells of antral follicles. It was also detected in interstitial cells, corpora lutea and ovarian surface epithelial cells. These suggested that BMP7 did not take part in the activation of a dominant primordial follicle, but played a role in the primary/secondary transition and in the following maturation of follicles. Besides, BMP7 was not only the cytokine of theca interna cells but also that of oocytes and granulosa cells. BMP7 might also participate in the regulatory activities of corpora lutea, ovulation, etc.

**Key words** rabbit, bone morphogenetic protein 7 (BMP7), ovary, immunohistochemistry

随着生殖技术的发展, 人们对卵巢卵泡发育的调节机制的认识不断深入, 传统的下丘脑-垂体-卵巢轴, 已不再是卵巢功能唯一的调节因素。研究表明, 在卵巢局部还存在一个多因子调节系统或网络。它们通过自分泌或旁分泌的方式调控卵泡的发生发育, 影响优势卵泡的选择以及闭锁卵泡的形成等。Shimasak 等<sup>[1]</sup>首次报道, 哺乳动物卵巢中存在功能性骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein system, BMPs)。研究显示, 哺乳动物卵泡发生和发育伴随着 BMPs 的组织特异性表达, 并且具有物种差异性<sup>[2]</sup>。BMP7 是 BMPs 重要成员之一, Erickson 等<sup>[3]</sup>、Lee 等<sup>[4]</sup>、Fateh<sup>[5]</sup>、Abir 等<sup>[6]</sup>和 Jennifer 等<sup>[7]</sup>分别对其在大鼠、牛、人、绵羊卵巢中的定位及其作用进行了研究, 而对兔的研究尚未见报道。本实验用免疫组化方法对兔卵巢中 BMP7 蛋白进行定位研究, 以探索它在兔卵巢中的表达模式, 揭示其在卵母细胞成熟和卵泡发育以及黄体化和排卵过程中的作用。

收稿日期: 2009-05-20

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK200505) 资助项目。

通讯联系人: 冢桐, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物生殖与调控研究。E-mail: jltong@yzu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

试验用 5月龄新西兰大白兔,购自南京市金陵种兔场。

#### 1.1.2 主要试剂

一抗: BMP15 即用型 SABC(过氧化物酶)试剂盒: 5% BSA 封闭液、生物素标记的单克隆小鼠抗兔 IgG 及 SABC, DAB 显色试剂盒 (AR1022), 苏木素, 多聚赖氨酸均购自武汉博士德 (Booster) 生物工程有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器

Leica CM 1100 冰冻切片机 (上海莱卡公司)、海尔冰箱。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 兔卵巢组织的获取及制片

取兔的新鲜卵巢组织,分离其周围的脂肪组织,用 PBS 溶液洗涤 3~5 次,用 OCT 包埋,置于 -20℃ 冰冻切片机中 20 min, 然后对组织进行连续切片,厚度为 4~8 μm。

#### 1.2.2 免疫组织化学方法

将切片于超净台中放置约 15 min, 吹干后放入 4% 多聚甲醛中固定 1h, 放入 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1份 + 纯甲醇 50份 (体积比) 的混合液中, 封闭内源性过氧化物酶活性; 5% BSA 封闭液, 室温 20 min, 加 BMP15 抗体 (1:300), 4℃ 孵育过夜; 生物素标记小鼠抗兔 IgG, 37℃ 孵育 20 min, 滴加 SABC 后进行 DAB 显色, 苏木素轻度复染, 显微镜观察。阴性对照组采用 PBS 替代一抗, 其余步骤相同。

## 2 判断标准

免疫组化检测阳性信号为棕黄色着色, 其着色明显高于背景, 根据着色深浅分级: 强阳性: 深棕色; 中度阳性: 棕黄色; 弱阳性: 浅棕或浅黄色; 阴性: 无色, 背景清洁。

## 3 结果

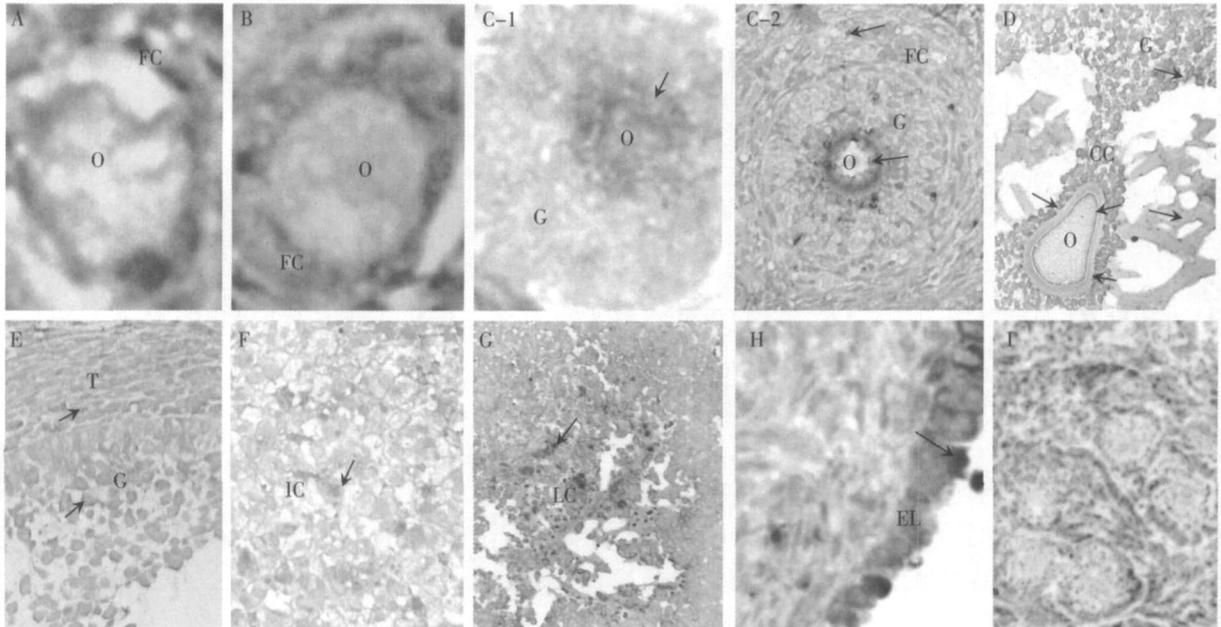
免疫组化结果显示: 在兔卵巢原始卵泡 (图 A) 和初级卵泡 (图 B) 中都没有检测到 BMP7 蛋白; 在不同大小次级卵泡 (图 C-1, C-2) 卵母细胞中都检测到 BMP7 蛋白的强阳性信号, 在卵泡膜中少数细胞也有弱阳性信号, 在颗粒细胞中没有检测到阳性信号, 但是在颗粒细胞的间隙有弱的阳性着色; 在有腔卵泡 (图 D) 的卵丘细胞和内部壁层颗粒细胞及卵泡液中都有 BMP7 蛋白的强阳性信号, 卵泡内膜细胞的部分细胞群 (图 E) 检测到中度阳性信号, 而卵母细胞中的信号非常微弱, 但是透明带中的信号呈强阳性; 在卵巢基质 (图 F) 中具有广泛的强阳性信号, 主要存在于间质细胞和血管壁; 另外 BMP7 蛋白在卵巢黄体 (图 G) 及卵巢上皮细胞 (图 H) 中也有强阳性着色。

## 4 讨论

卵巢卵泡发生包括一系列连续的步骤, 其主要步骤包括原始/初级卵泡转化, 初级/次级卵泡转化, 优势卵泡选择和闭锁。卵泡发生的首要标志是静止的原始卵泡被激活, 此后即为原始/初级卵泡转化<sup>[8]</sup>。原始卵泡被激活的首要症状是, 颗粒细胞由扁平状变成立方状。当此过程发生时, 颗粒细胞开始增殖, 卵泡开始生长。而初级/次级卵泡转化的主要事件则是复层颗粒细胞的发育。卵巢上卵泡数量很多, 一般只有优势卵泡发育成熟, 而绝大多数卵泡因闭锁而死亡。有丝分裂迅速停止, 颗粒细胞凋亡的开始是卵泡闭锁的标志<sup>[9]</sup>。有证据表明, BMPs 参与了卵泡发生过程, BMP7 作为重要成员之一亦发挥了重要作用<sup>[2]</sup>。

ShimaSak 等<sup>[11]</sup>利用生长在无血清培养基的颗粒细胞的初级培养物, 发现重组 BMP7 能够调节 FSH 信号, 在某种程度上促进雌二醇的产生, 而抑制孕酮的生物合成, 其生物活性与人们长期以来渴望寻找的黄体抑制因子相一致。Lee 等<sup>[4]</sup>研究表明, 小鼠颗粒细胞中, BMP7 增进被 FSH 诱导的 P450 芳香化酶 mRNA 的表达, 而抑制被 FSH 诱导的类固醇合成的强烈调控蛋白 (StAR)。BMP7 对 FSH 依赖的雌二醇和孕酮生成的特异调控能力在于所起的媒介作用, 即通过 P450 芳香化酶和 StAR 的特异表达而起作用。并且通

过将 BMP7 注射到小鼠卵巢囊,发现 BMP7 能够促进原始卵泡向生长卵泡的募集; Erickson 等<sup>[3]</sup>报道,大鼠卵泡膜细胞、次级间质细胞产生的 BMP7 能够刺激大鼠颗粒细胞 DNA 的合成,具有促进颗粒细胞增殖,抑制凋亡的能力. BMP7 具有促进颗粒细胞增殖,抑制凋亡以及促进雌二醇的产生,而抑制孕酮的生物合成的能力,揭示了一种通过 BMP7 促进原始/初级卵泡转化以及初级/次级卵泡转化的可能机制,可以部分解释其促进卵泡成熟、抑制过早黄体化的机制.



A:原始卵泡×400, B:初级卵泡×400, C-1:次级卵泡×300, C-2:次级卵泡×200, D:有腔卵泡×300, E:有腔卵泡膜细胞×400, F:间质细胞×400, G:黄体×300, H:卵巢上皮×400, I:阴性对照卵巢×200  
O:卵母细胞, G:颗粒细胞, CC:卵丘细胞, T:膜细胞, FC:卵泡细胞, IC:间质细胞, LC:黄体细胞, EL:卵巢上皮细胞, ↑:阳性信号

图 1 BMP7 在兔卵巢中的免疫组织化学定位

Fig.1 BMP7 immunoreactivity in the differert structures found within rabbit ovaries

本研究通过免疫组化显示, BMP7 蛋白在兔卵巢原始卵泡和初级卵泡中都没有表达,而在次级卵泡和有腔卵泡都具有较强的表达.提示 BMP7 没有参与兔原始卵泡的激活,而在初级/次级卵泡转化以及随后的卵泡成熟过程中发挥了作用.这与 Lee 等<sup>[4]</sup> BMP7 能够激活大鼠卵巢原始卵泡的研究结果不同.尤其值得注意的是, BMP7 在兔卵泡中的定位非常广泛,说明 BMP7 不仅仅是内膜细胞分泌因子,而且也是卵母细胞和颗粒细胞分泌因子,在调节兔卵泡生长方面可能具有旁分泌和/或自分泌作用,就像另外 2 个卵母细胞来源的 BMPs 成员——BMP15 和 GDF9 一样<sup>[1]</sup>.这与 Erickson 等<sup>[3]</sup>对大鼠的研究不同,大鼠 BMP7 的 mRNA 主要存在于卵泡膜细胞中,在卵母细胞及卵泡其他细胞中的表达未见报道.但是 Fateh 等<sup>[5]</sup>报道,在牛有腔卵泡膜细胞中检测到了 BMP7 免疫活性蛋白,一些卵母细胞也有阳性染色; Abir R 等<sup>[6]</sup>对人的研究中, BMP7 及受体蛋白仅在胎儿和妇女颗粒细胞中检测到,卵母细胞中虽未检测到 BMP7 受体蛋白,但却检测到它们的转录本; Jennifer 等<sup>[7]</sup>在绵羊任何大小的健康卵泡的颗粒细胞、膜细胞、卵丘细胞或卵母细胞中都没有观察到 BMP7 mRNA 的表达.一系列研究显示, BMP7 在不同动物卵巢中的表达模式具有差异性.此外, BMP7 在兔卵泡内膜细胞部分细胞群的表达与 Erickson 等<sup>[3]</sup>对大鼠研究相似. Erickson 等<sup>[3]</sup>发现大鼠健康卵泡的卵泡内膜似乎由两个独立的间质细胞膜群组成,紧靠卵泡外膜的一个群表达 BMP4 靠近卵泡基底膜的一个群表达 BMP7,这些差异始于次级卵泡阶段,并贯穿整个卵泡发生期.这一差异提示,在卵泡生长和卵泡发育阶段卵泡膜存在功能性差异.

实验还显示, BMP7 蛋白在兔卵巢间质细胞中表达.这与 Erickson 等<sup>[3]</sup>对成年大鼠的研究一致.间质细胞来源于闭锁卵泡内膜,其生理作用并不十分清楚. Erickson 等<sup>[3]</sup>发现大鼠在发情前 2 000 h 间质细胞内卵泡抑制素 mRNA 的表达量很大,由于间质细胞是 LH 的靶细胞,可以推测排卵前的 LH 峰可能与排卵前 2 000 h 这些细胞内卵泡抑制素基因表达有关.以 BMPs 抗黄体化特性为基础<sup>[1]</sup>,间质细胞内卵泡抑制素表达的突然增加有可能中和了卵巢 BMPs 活性,从而可以使排卵前孕激素增加,诱导大鼠的排卵和交配

行为.兔卵巢内间质细胞中BMP7的存在,是否提示有同样的机制存在还有待进一步研究.

此外,实验还观察到BMP7蛋白存在于兔卵巢黄体及表面上皮中.据Erickson等<sup>[3]</sup>报道,大鼠黄体BMPs表达的时空模式在黄体溶解过程中起着重要的变化,Yamamoto<sup>[10]</sup>等在人、恒河猴,Silva等<sup>[11]</sup>在羊卵巢黄体细胞中发现有GDF9蛋白表达.Erickson等<sup>[3]</sup>报道,在正常的周期性大鼠卵巢表面上皮中有BMP3,4,6的基因表达,卵巢上皮细胞中存在BMPs可能与排卵点形成有关.兔卵巢中BMP7是否参与了黄体活动及排卵点形成还有待更多的研究.

#### [参考文献]

- [1] Shinasaki S, Zachow R J, Li D, et al. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(7): 282-287.
- [2] Shinasaki S, Kelly R, Fumio O, et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction[J]. Endocrine Reviews, 2003, 25(1): 72-101.
- [3] Erickson G F, Shinasaki S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle[J]. Reprod Biol Endoc, 2003, 1: 9.
- [4] Lee W, Otsuka F, Moore R K, et al. The effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat[J]. Biol Reprod, 2001, 65: 994-999.
- [5] Fatehi A N, van den Hurk R, Colenbrander B, et al. Expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during VM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development[J]. Theriogenology, 2005, 63: 872-889.
- [6] Abir R, Ben-Hamouh A, Melamed N, et al. Expression of bone morphogenetic protein 4 and 7 and their receptors IA, IB, and II in human ovaries from fetuses and adults[J]. 2008, 89(5 Suppl): 1430-1440.
- [7] Jennifer L Juengel, Karen L Reader, Adrian H Bibby, et al. The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat[J]. Reproduction, 2006, 131: 501-513.
- [8] Erickson G F. The ovary: basic principles and concepts[C]//Felig P, Frohman L. Endocrinology and metabolism. 4th ed. New York: McGraw Hill, 2001: 707-743.
- [9] Tilly J L. Apoptosis and ovarian function[J]. Rev Reprod, 1996, 1: 162-172.
- [10] Yamamoto N, Christenson L K, McAllister J M, et al. Growth differentiation factor-9 inhibits 3'-5'-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells[J]. Clin Endocrinol Metab, 2002, 87: 2849-2856.
- [11] Silva RV, Van D Van T, et al. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), Bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats[J]. Molecular reproduction and development, 2005, 70: 11-19.

[责任编辑:孙德泉]