

Bmp8a 和 *Bmp8b* 基因在体外培养小鼠卵巢颗粒细胞中的表达

王建起 Selvaraj J. NIMAL 曹文广*

(中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要 为研究体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因的表达情况,用 10 IU PMSG 皮下注射 21~23 日龄健康雌性 ICR 小白鼠,48 h 后刺破卵泡获取颗粒细胞,置入 10% FBS 的 DMEM/F12 中体外培养 5 d,用 Trizol 提取总 RNA,RT-PCR 验证后切取目的 DNA 片段进行测序。RT-PCR 测序结果表明体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞可扩增 BMP-8a transcript variant 2 和 BMP-8b 的 mRNA 序列,不扩增 BMP-8a transcript variant 1 的 mRNA 序列。结果显示体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞可表达 BMP-8a transcript variant 2 和 *Bmp8b* 基因。

关键词 小鼠; 卵巢颗粒细胞; *Bmp8a*; *Bmp8b*

中图分类号 Q 2 文章编号 1007-4333(2013)03-0108-07 文献标志码 A

Expressions of *Bmp8a* and *Bmp8b* in cultured mouse granulosa cells

WANG Jian-qi, Selvaraj J. NIMAL, CAO Wen-guang*

(Institute of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract This study was to analyze the expressions of *Bmp8a* and *Bmp8b* in cultured mouse granulosa cells, for further understanding of the mechanism of follicular development. Twenty-one to twenty-three day-old female mice were hypodermically injected with 10IU of PMSG. After 48 hours, the bilateral ovaries were removed and the granulosa cells were collected by piercing the ovarian follicles. The granulosa cells were seeded in cell culture plates in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. After 5 days, the cells were collected from the wells and total RNA was extracted. The expressions of *Bmp8a* and *Bmp8b* were analyzed by RT-PCR and confirmed by sequencing. RT-PCR sequencing results showed that *in vitro* cultured mouse granulosa cells generated BMP-8a transcript variant 2 and BMP-8b mRNA. And BMP-8a transcript variant 1 mRNA was found to be absent. Our results showed that *in vitro* cultured mouse granulosa cells could express BMP-8a transcript variant 2 and *Bmp8b*.

Key words mice; granulosa cells; *Bmp8a*; *Bmp8b*

BMP-8a(bone morphogenetic protein-8a, 骨形态发生蛋白-8a)又称 OP-2(osteogenic protein-2, 骨形成蛋白-2),BMP-8b 又称 OP-3, 都类属于 TGF- β 家族^[1]。小鼠 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因位于第 4 条染色体上,紧密连锁,并且有着相似的基因结构(内含子/外显子的大小和边界)^[1]。小鼠 *Bmp8a* 基因有 2 种转录变体:BMP-8a transcript variant 1^[2] 和 BMP-8a transcript variant 2^[1,3-4]。目前已报道

Bmp8a 或 *Bmp8b* 基因在小鼠早期胚胎^[4-5]、胎盘及子宫^[1]、睾丸^[1,3]、骨组织^[6-10]、脂肪组织^[10]、下丘脑^[10]、内耳^[11]及出生后不久的毛囊根鞘内部^[1]等组织中都有表达,欧洲分子生物学实验室-欧洲生物信息研究所(EMBL-EBI)详细记载了 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因在各组织和细胞的表达情况。Zhao 等用 RNA 酶保护分析方法检测成年小鼠脑、骨骼肌、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、胸腺和卵巢等组织中均未有

收稿日期: 2012-09-11

基金项目: 国家转基因重大专项资助(2011ZX08008-003)

第一作者: 王建起, 硕士研究生, E-mail: jqwang@yahoo.com

通讯作者: 曹文广, 研究员, 博士生导师, 主要从事动物转基因和多功能干(iPS)细胞等研究, E-mail: wgcao@iascaas.net.cn

Bmp8a 和 *Bmp8b* 基因表达^[1];此外,还检测到交配后 7.5~10.5 d 的胚胎不表达 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因,这与 Ozkaynak 等和 Ying 等的研究结果不同^[4-5]。Ozkaynak 等用 Northern 杂交方法在 8 d 的小鼠胚胎中发现了 *Bmp8a* 基因^[4];Ying 等用原位杂交的方法发现 *Bmp8b* 基因在 5.5~7.5 d 的胚胎中表达,并能促进原始生殖细胞的形成^[5];从以上研究可以看出 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因在小鼠早期胚胎中确实能够表达^[4-5],而 Zhao 等用 RNA 酶保护分析方法未能得到此结果^[1]。BMP-8a 和 BMP-8b 对小鼠生殖系统的发育起着至关重要的作用,可参与精子发生^[1,3]、胎盘和子宫发育^[1]等,BMP-8b 还可参与小鼠原始生殖细胞的形成^[5,12],因此 BMP-8a 和 BMP-8b 也可能在卵泡发育中发挥作用。卵巢颗粒细胞位于卵泡内,卵母细胞和卵泡膜细胞之间,可分泌多种与发情或性腺发育有关的激素和生长因子,与卵母细胞和卵泡膜细胞协作调节卵泡发育^[13]。本试验用 RT-PCR 测序方法研究 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因在体外培养小鼠卵巢颗粒细胞中的表达情况,旨在深入了解某卵泡的发育过程。

1 材料与方法

1.1 试验材料

ICR 小白鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。21~23 日龄雌性小鼠由实验室自繁。孕马血清促性腺激素(兽药字(2011)110254565)购自宁波第二激素厂,胎牛血清(SH30370.03)购自 Hyclone 公司(美国),DMEM/F12(08-019)购自北京钮因华信科技发展有限公司,链霉素(国药准字 H13020650)和青霉素(国药准字 H13020657)购自华北制药集团有限责任公司,逆转录试剂盒(A3500)购自 Promega 公司(美国),*Taq* 酶(DR001A)购自 TaKaRa 公司(日本);50 bp DNA marker(Cat # MD108),marker III (Cat # MD103)购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物的设计

小鼠 FSHR (follicle-stimulating hormone receptor, 卵泡刺激素受体)、LHR (luteinizing hormone receptor, 黄体生成素受体)、BMP-8a transcript variant 1、BMP-8a transcript variant 2 和 BMP-8b 的 mRNA 序列均摘自美国国立生物技术

信息中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, NCBI) 的 GenBank。BMP-8a transcript variant 2 在 BMP-8a transcript variant 1 的编码区第 1050-1088 位少了 39 个核苷酸 GGTCAGTACCACAG-TAGCCTGCTGCGACAGGTGGAGCGG, 此变异区域位于 BMP-8a 的成熟肽,编码区其余序列两者相同。引物设计由 NCBI 的 Primer-BLAST 软件完成。引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成(表 1)。每对引物均跨外显子。引物 a-2 的扩增目的产物包含了 BMP-8a 转录变异体的变异区域,a-2 如果扩增 BMP-8a transcript variant 1,产物长度为 355 bp;a-2 如果扩增 BMP-8a transcript variant 2,产物长度为 316 bp。引物 V1-1 和 V1-2 为 BMP-8a transcript variant 1 的 mRNA 序列特异引物,引物 V2 为 BMP-8a transcript variant 2 的 mRNA 序列特异引物。

1.2.2 细胞培养

21~23 日龄健康的雌性 ICR 小白鼠皮下注射 10 IU 的 PMSG,48 h 后用不锈钢针头刺破卵泡获得颗粒细胞。12 孔细胞培养板每孔孵育平均每只卵巢获得的颗粒细胞的数量,置入含 10% FBS 的 DMEM/F12 中培养,青霉素和链霉素各为 100 IU/mL,培养环境为 37 °C,5% CO₂,95% 空气,100% 相对湿度,小鼠卵巢颗粒细胞培养方法详见参考文献[14]。

1.2.3 RT-PCR 测序

小鼠卵巢颗粒细胞培养 5 d 后用 Trizol 提取总 RNA,测 RNA 浓度后立即进行反转录。反转录体系为 20 μL,RNA 模板含量为 1.5 μg,其余操作严格按照 Promega 说明书进行。PCR 反应体系为 20 μL,cDNA 模板量为 2 μL,引物浓度为 0.1 nmol/μL,其余操作严格按照 TaKaRa 说明书进行。反应程序为 95 °C 变性 3 min→94 °C 变性 30 s→退火 30 s→延伸 30 s→继续延伸 10 min,其中第 2 步至第 4 步,FSHR 和 LHR 的 mRNA 序列引物的 PCR 设 28 个循环,BMP-8a 和 BMP-8b 的 mRNA 序列引物的 PCR 设 32 个循环。PCR 完成后,6 μL 样品用琼脂糖电泳检测,条件为 1.5% 琼脂糖凝胶,70 V 电压 60 min。切取目的 DNA 片段,胶回收后由英潍捷基公司测序。试验共重复 3 次,每次 3 个平行试验和 1 个对照试验;阴性对照的 PCR 用等量的水代替了 cDNA 模板。

表1 小鼠 mRNA 序列引物

Table 1 Primers of mouse mRNA sequences

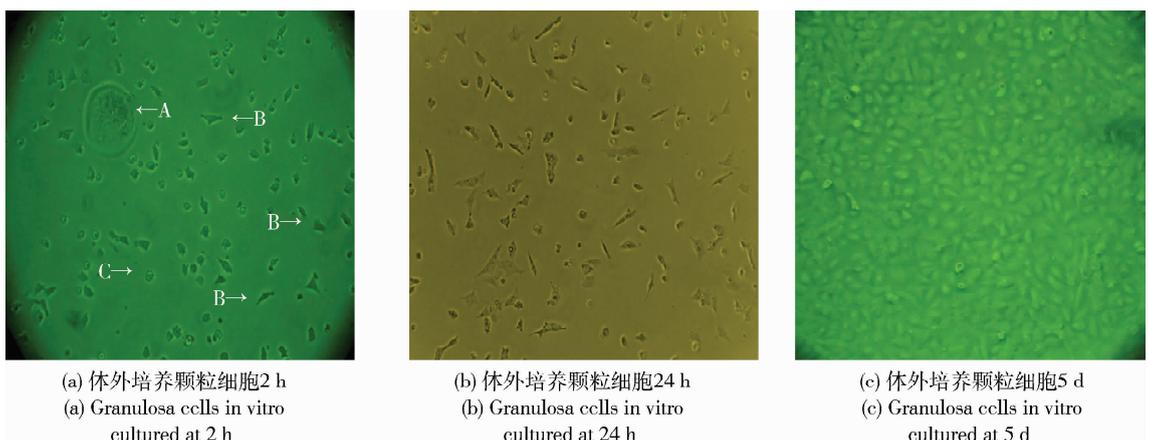
目的 mRNA mRNA	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	扩增片段长度/bp Amplified fragment length	退火温度/°C Annealing temperature
FSHR	F	Forward 5'-ACTGTGCATTCAACGGAACC-3' Reverse 5'-GGTTGGGCAGGGAATAGACC-3'	147	62.0
LHR	L	Forward 5'-ACCCGGTGCTTTTACAAACCT-3' Reverse 5'-CGAGATTAGCGTCGTCGCCATT-3'	259	62.0
BMP-8a transcript variant 1	V1-1	Forward 5'-TGGACTGGGTCATCGCCCC-3' Reverse 5'-TTCATCAGGTGCACCCCGCTC-3'	166	62.0
BMP-8a transcript variant 1	V1-2	Forward 5'-TGGAAACCGCGGATGGGCAC-3' Reverse 5'-TCCACCTGTCGAGCAGGCTA-3'	435	62.0
BMP-8a transcript variant 2	V2	Forward 5'-TGCCATCTTGCAGTCTCTGGTGC-3' Reverse 5'-AAGGGCCTCCATTGCCCT-3'	282	62.0
BMP-8a	a-1	Forward 5'-TGTGGAAACCGCGGATGGGC-3' Reverse 5'-TCAGTGGTCTCGCTGCCGA-3'	149	62.0
BMP-8a	a-2	Forward 5'-CAGGGCTACTCTGCCTATTA-3' Reverse 5'-GAAGGGTTTCTGCCTCTGG-3'	316 或 355	62.0
BMP-8b	b-1	Forward 5'-CCACGCCACTATGCAGGCC-3' Reverse 5'-GGCTACTGAGGTCACCAGGGTT-3'	360	67.5
BMP-8b	b-2	Forward 5'-CAACCACGCCACTATGCAGGC-3' Reverse 5'-GCCTGAGCTCTACCCTGTGTTC-3'	508	67.5

2 试验结果

2.1 小鼠卵巢颗粒细胞体外培养的生长习性

体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞, 2 h 后细胞开始贴壁, 呈梭形, 三角形或不规则形, 此外还混有卵

母细胞和其他杂细胞及一些组织碎片(图 1(a)); 细胞培养 24 h, 大部分细胞已充分伸展, 少数细胞开始聚集或正在分裂(图 1(b)), 换液后杂细胞或组织基本可去除; 细胞培养 5 d 后基本铺满整个 12 孔板, 呈铺路状(图 1(c))。



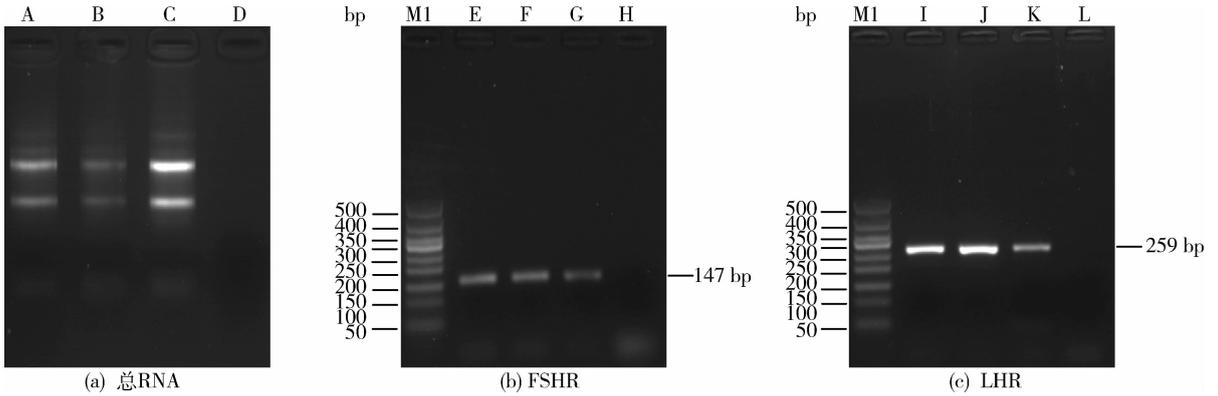
A. 卵母细胞, B. 颗粒细胞, C. 杂细胞或组织碎片。A. oocyte, B. granulosa cell, C. fragment of tissue or hybrid cell.

图1 体外培养小鼠卵巢颗粒细胞的生长(×400)

Fig. 1 Growth of *in vitro* cultured mouse granulosa cells(×400)

通过检测 *Fshr* 和 *Lhr* 基因的表达, 确认此法培养的小鼠卵巢颗粒细胞能够维持其主要的生理功能。提取的总 RNA 未见明显的 RNA 降解, 可用于反转录(图 2(a))。小鼠 FSHR 和 LHR 的 mRNA 序列引物均扩增出了目的长度的产物, 且没有杂带(图 2(b)、(c))。小鼠 FSHR 的 mRNA 序列引物的 PCR 产物经胶回收纯化测序, 测序长度为 147 bp, 序列经 NCBI 的 Blast 软件分析, 与小鼠 FSHR 的

mRNA 序列有 100% 的一致性。小鼠 LHR 的 mRNA 序列引物的 PCR 产物经胶回收纯化测序, 测序结果的片段长度为 259 bp, 序列经 NCBI 的 Blast 软件分析, 与小鼠 LHR 的 mRNA 序列有 100% 的一致性。此方法培养的小鼠颗粒细胞能够表达颗粒细胞膜受体 FSHR 和 LHR, 因此说明此方法培养的小鼠颗粒细胞能够维持其主要的生理功能, 可用于后续试验。



A, B, C, E, F, G, I, J 和 K 为样品; D, H 和 L 为阴性对照。M1 为 50 bp marker。
A, B, C, E, F, G, I, J 和 K samples; D, H and L negative control; M1 50 bp marker.

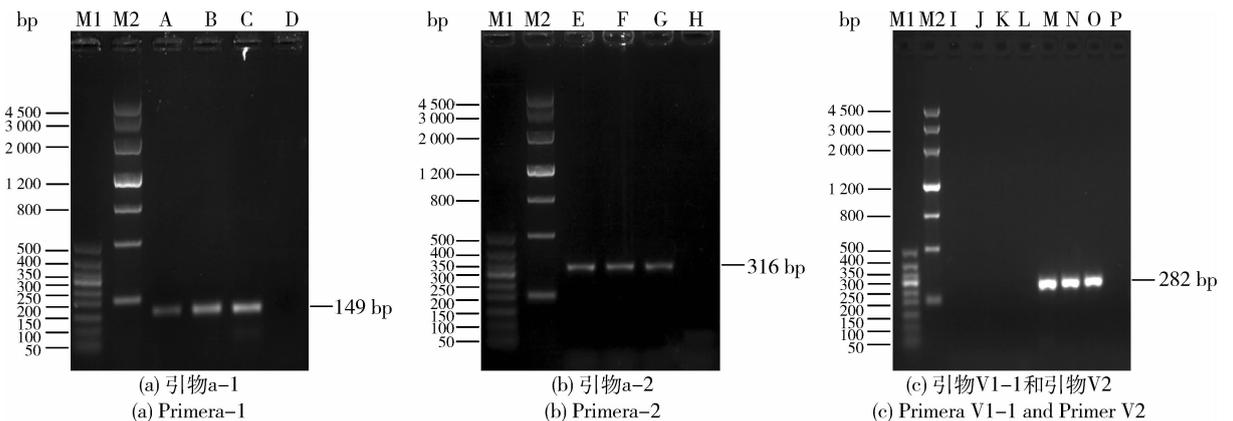
图 2 *Fshr* 和 *Lhr* 基因在体外培养小鼠卵巢颗粒细胞中的 RT-PCR 分析

Fig. 2 RT-PCR analysis of *Fshr* and *Lhr* gene in cultured mouse granulosa cells

2.2 RT-PCR 测序表明体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞可表达 BMP-8a transcript variant 2

RT-PCR 测序表明体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞可表达 BMP-8a transcript variant 2, 并初步证

明不表达 BMP-8 transcript variant 1。BMP-8a 的 mRNA 序列引物 a-1 和 a-2 的 RT-PCR 产物电泳图分别如图 3(a)、(b) 所示。BMP-8a transcript variant 1 的特异引物 V1-1 和 BMP-8a transcript



A, B, C, E, F 和 G 为样品产物; I, J 和 K 为引物 V1-1 产物; M, N 和 O 为引物 V2 产物; D, H 和 P 为阴性对照。M1 为 50 bp marker; M2 为 marker III。A, B, C, E, F 和 G sample products; I, J and K sample products of primer V1-1; M, N and O sample products of primer V2; D, H and P negative control, M1 50 bp marker; M2 marker III.

图 3 *Bmp8a* 基因在体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞中的 RT-PCR 分析

Fig. 3 RT-PCR analysis of *Bmp8a* gene in cultured mouse granulosa cells

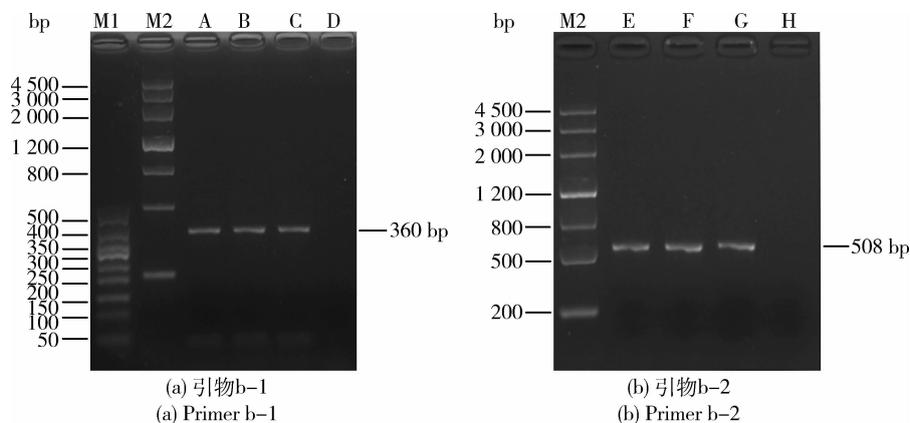
variant 2 的特异引物 V2 的 RT-PCR 产物电泳图见图 3(c)。BMP-8a transcript variant 1 的特异引物 V1-2 也不能扩增目的产物,其产物的电泳图没有列出。

BMP-8a 的 mRNA 序列引物 a-1 扩增了目的长度的产物(图 3(a)),且没有杂带,阴性对照未扩增,其目的 DNA 经胶回收纯化测序,测序长度为 149 bp,序列经 NCBI 的 Blast 软件分析,与 BMP-8a 的 mRNA 序列的一致性为 100%。BMP-8a 的 mRNA 序列引物 a-2 的目的产物包含了 2 个 BMP-8a 转录变异体的变异区间,如果小鼠卵巢颗粒细胞同时表达 BMP-8a transcript variant 1 和 BMP-8a transcript variant 2,引物 a-2 会扩增出 2 条带,1 条带长度为 355 bp,1 条带长度为 316 bp。BMP-8a 的 mRNA 序列引物 a-2 只扩增 1 条带(图 3(b)),阴性对照未扩增,因此小鼠卵巢颗粒细胞有可能只表达 2 种转录变异体中的 1 个,其目的 DNA 经胶回收纯化测序,测序长度为 316 bp,序列经 NCBI 的 Blast 软件分析,与 BMP-8a transcript variant 2 的一致性为 100%。从图 3(a)、(b)可看出小鼠卵巢颗粒细胞能够表达 BMP-8a transcript variant 2,但还不能确定是否表达 BMP-8a transcript variant 1,因

此笔者又设计了 BMP-8a transcript variant 1 的特异引物 V1-1 和 V1-2 及 BMP-8a transcript variant 2 的特异引物 V2。BMP-8a transcript variant 1 的特异引物 V1-1 和 V1-2 均不能扩增目的产物,引物 V1-1 的 RT-PCR 产物电泳图如图 3(c)所示;BMP-8a transcript variant 2 的特异引物 V2 扩增了目的长度的产物(图 3(c)),其目的 DNA 经胶回收纯化测序,测序长度为 282 bp,序列经 NCBI 的 Blast 软件分析,与 BMP-8a transcript variant 2 的一致性为 100%。从图 3(b)、(c)可看出:1) BMP-8a transcript variant 1 的特异引物不能扩增目的产物,2) BMP-8a transcript variant 2 的特异引物扩增了目的产物,3) 包含 BMP-8a 转录变异区域的引物只扩增 BMP-8a transcript variant 2,以上 3 个结论说明体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞可表达 BMP-8a transcript variant 2,并初步证明不表达 BMP-8a transcript variant 1。

2.3 RT-PCR 测序表明体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞可表达 *Bmp8b*

RT-PCR 测序表明体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞可表达 *Bmp8b*。BMP-8b 的 mRNA 序列引物 b-1 和 b-2 的 RT-PCR 产物电泳图见图 4。



A、B、C、E、F 和 G 为样品产物,D 和 H 为阴性对照。M1 为 50 bp marker;M2 为 marker III。
A、B、C、E、F and G sample products;D and H negative control;M1 50 bp marker;M2 marker III.

图 4 *Bmp8b* 基因在体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞中的 RT-PCR 分析

Fig. 4 RT-PCR analysis of *Bmp8b* gene in cultured mouse granulosa cells

BMP-8b 的 mRNA 序列引物 b-1 和 b-2 均扩增了目的长度的产物(图 4),且没有杂带,空白对照未扩增。引物 b-1 扩增的 DNA 经胶回收纯化测序,测序长度为 360 bp,序列经 NCBI 网站的 Blast 软件分

析,与 BMP-8b 的 mRNA 序列一致性为 100%。引物 b-2 扩增的 DNA 经胶回收纯化测序,测序长度为 508 bp,序列经 NCBI 网站的 Blast 软件分析,与 BMP-8b 的 mRNA 序列一致性为 100%。BMP-8b

的 mRNA 序列引物 b-1 和 b-2 均能扩增出目的产物,说明体外培养的小鼠颗粒细胞能够表达 *Bmp8b* 基因。

3 讨论

3.1 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因在小鼠卵巢颗粒细胞中的表达

Bmp8a 基因的 2 个转录变异体是由于可变剪切造成的,转录变异位点位于第 6 外显子 3'末端的 39 个核苷酸,与第 7 外显子直接相接。已知在小鼠早期胚胎^[4-5]、雄性生殖细胞^[1,3]、胎盘^[1]、内耳^[11]及出生后不久的毛囊根鞘内部^[1]等均表达 BMP-8a transcript variant 2,目前仅在小鼠胚胎听泡中发现表达 BMP-8a transcript variant 1^[12]。RT-PCR 测序表明小鼠卵巢颗粒细胞只表达 BMP-8a transcript variant 2,不表达 BMP-8a transcript variant 1,这与目前 BMP-8a 在相关组织大多能够表达 BMP-8a transcript variant 2 的情况相同。BMP-8a 的转录变异位点位于成熟肽区域,但目前还没有足够的证据表明此变异区域是如何影响 BMP-8a 的功能,已知 *Bmp8a* 碱基的突变可使感染肝炎的机率更大^[15-16]。小鼠 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因在染色体上紧密连锁^[5],其编码区序列的一致性在 TGF- β 的超家族成员中最高,两者可协同发挥作用^[1],本研究发现小鼠卵巢颗粒细胞也能够同时表达 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因。Lattin 等用微阵列分析方法检测了小鼠 91 个不同组织或细胞的基因表达情况^[17],发现 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 在小鼠卵巢中的信号要低于该基因整体的平均水平,因此,*Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因在小鼠卵巢内的表达量可能不高;*Bmp8a* 或 *Bmp8b* 基因在脑^[11-12]、早期胚胎^[4,10]和卵巢中表达,但 Zhao 等用 RNA 酶保护分析方法未检测出^[1],很可能与 *Bmp8a* 或 *Bmp8b* 在相关组织中表达量低有关。

3.2 小鼠 BMP-8a 和 BMP-8b 的生理功能

BMP-8a 或 BMP-8b 可促进小鼠生殖系统发育^[1-4]、毛囊发育^[1]和促进骨生长^[7-11]等作用,表明 BMP-8a 或 BMP-8b 很可能主要对小鼠个体的生长发育起着重要的作用。Ying 等发现 BMP-4 和 BMP-8b 的联合作用能够诱导小鼠原始生殖细胞的形成^[3];Zhao 等通过人工生产 *Bmp8b* 基因突变的

小鼠来研究 BMP-8b 对小鼠精子发生的影响^[2],发现纯合突变的小鼠有不同程度的精细胞缺陷,甚至不育,2 周大小鼠的精细胞增殖和分化都有明显的缺陷,体外培养成年小鼠的精原细胞有更显著的死亡导致精细胞耗尽而不育,这 2 个研究都表明 BMP-8b 对雄性小鼠生殖系统和生殖细胞的发育起着至关重要的作用。*Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因在发育中的子宫和胎盘中表达,表明 BMP-8a 和 BMP-8b 对雌性动物的生殖系统的发育也发挥着作用。BMPs 家族中 *Bmp2*、*Bmp3*、*Bmp4*、*Bmp6*、*Bmp7* 和 *Bmp15* 等基因均在小鼠卵巢中表达^[13],并对卵泡发育起着至关重要的作用,本研究结果表明小鼠卵巢颗粒细胞能够表达 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因,因此,BMP-8a 和 BMP-8b 也很有可能对雌性小鼠的性腺发育尤其是卵泡发育发挥着至关重要的作用。BMP-8a 和 BMP-8b 均为分泌蛋白质,因此小鼠卵泡可通过旁分泌的方式影响卵母细胞和卵泡膜细胞的生理调控,或是通过自分泌的方式影响卵巢颗粒细胞的增殖及激素分泌。小鼠 BMP-8a transcript variant 2 和 BMP-8b 的前原蛋白基因序列的一致性为 91%,成熟肽基因序列的一致性为 83%,2 个基因在染色体上紧密连锁,暗示 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因来源于同一基因的复制,两者的基因表达方式相似,又以精密的调节发挥着不同的作用^[1],因此可为基因进化的研究提供素材。

目前对 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 的基因表达和生理功能的研究相对较少,本研究表明体外培养的小鼠卵巢颗粒细胞能够表达 BMP-8a transcript variant 2 和 *Bmp8b* 基因,而更深入地研究小鼠卵巢颗粒细胞 *Bmp8a* 和 *Bmp8b* 基因在各级卵泡中的表达调控和其生理功能,将有助于更进一步地了解哺乳动物卵泡发育的机理。

参 考 文 献

- [1] Zhao G Q, Hogan B L. Evidence that mouse *Bmp8a* (*Op2*) and *Bmp8b* are duplicated genes that play a role in spermatogenesis and placental development[J]. *Mech Dev*, 1996, 57(2): 159-168
- [2] Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H, et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. *PNAS*, 2002, 99(26): 16899-16903
- [3] Zhao G Q, Deng K, Labosky P A, et al. The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and

- maintenance of spermatogenesis in the mouse[J]. *Genes Dev.* 1996,10(13):1657-1669
- [4] Ozkaynak E, Schnegelsberg P N, Jin D F, et al. Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor-beta superfamily expressed early in embryogenesis[J]. *J Bio Chem.* 1992,267(35):25220-25227
- [5] Ying Y, Liu X M, Marble A, et al. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse[J]. *Mol Endocrinol.* 2000,14(7):1053-1063
- [6] DiLeone R J, King J A, Storm E E, et al. The Bmp8 gene is expressed in developing skeletal tissue and maps near the Achondroplasia locus on mouse chromosome 4[J]. *Genomics.* 1997,40(1):196-198
- [7] Fajardo M, Liu C J, Egol K. Levels of expression for BMP-7 and several BMP antagonists may play an integral role in a fracture nonunion: A pilot study[J]. *Clin Orthop Relat Res.* 2009,467(12):3071-3078
- [8] Cho T J, Gerstenfeld L C, Einhorn T A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing[J]. *J Bone Miner Res.* 2002,17(3):513-520
- [9] Kósa J P, Kis A, Bácsi K, et al. The protective role of bone morphogenetic protein-8 in the glucocorticoid-induced apoptosis on bone cells[J]. *Bone.* 2011,48(5):1052-1057
- [10] Whittle A J, Carobbio S, Martins L, et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions[J]. *Cell.* 2012,149(4):871-885
- [11] Carninci P, Hayashizaki Y. High-efficiency full-length cDNA cloning[J]. *Meth Enzymol.* 1999,303:19-44
- [12] Ying Y, Qi X, Zhao G Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways[J]. *PNAS.* 2001,98(14):7858-7862
- [13] Shimasaki S, Moore R K, Otsuka F, et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction[J]. *Endocr Rev.* 2004,25(1):72-101
- [14] 王妍,赵晓娥,杨培先,等.小鼠卵巢颗粒细胞的体外培养[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(8):11-14
- [15] Davila S, Froeling F E, Tan A, et al. New genetic associations detected in a host response study to hepatitis B vaccine[J]. *Genes Immun.* 2010,11(3):232-238
- [16] Saito T, Ji G, Shinzawa H, et al. Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C[J]. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004,317(2):335-341
- [17] Lattin J E, Schroder K, Su A I, et al. Expression analysis of G Protein-Coupled receptors in mouse macrophages [J]. *Immunome Res.* 2008(4):5

责任编辑:苏燕