

## BMP15 基因在不同品种鸡卵泡中的表达规律

李春苗<sup>1,2</sup>, 黎寿丰<sup>1,2\*</sup>, 赵振华<sup>1,2</sup>, 黄华云<sup>1,2</sup>, 王钱保<sup>1,2</sup>, 黄正洋<sup>1</sup>, 薛龙岗<sup>1</sup>

(1 中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225125; 2 扬州翔龙禽业发展有限公司, 扬州 225261)

**摘要:**以淮南麻黄鸡和邵伯鸡为试验素材, 研究骨形态发生蛋白 15 (bone morphogenetic protein 15, BMP15) 基因在 2 个群体卵泡颗粒层和膜层中的表达模式及差异。结果表明, 在颗粒层中, BMP15 在 2 个群体的卵泡不同发育时期表达模式均呈先增加后降低的趋势, 发育到小黄卵泡 (small yellow follicle, SYF) 时期呈现表达高峰, 显著高于其他各等级卵泡的表达量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 之后表达量显著下降; 不同时期同一等级卵泡颗粒层中的表达均表现为 24 周高于 43 周, 小黄卵泡时期表现为 24 周显著高于 43 周 ( $P < 0.05$ )。在膜层中, BMP15 在 2 个品种的卵泡不同发育时期表达模式均呈“低→高→低”的趋势, 表达高峰出现在小黄卵泡 (SYF) 时期, 显著高于其他各等级卵泡的表达量 ( $P < 0.05$ )。不同时期同一等级卵泡膜层中的表达基本相似, 均表现为 24 周表达量高于 43 周, 在小黄卵泡 (SYF) 时期膜层表达量表现为 24 周显著高于 43 周 ( $P < 0.05$ )。BMP15 基因的表达量在各级卵泡的颗粒层和膜层在 2 个群体间差异不显著。综合 BMP15 在 2 个群体不同时期卵泡的颗粒层和膜层中的表达模式研究表明, BMP15 在鸡的卵泡发育过程中的表达存在时间、品种和组织差异性。

**关键词:** 鸡; BMP15; 卵泡发育

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)06-1000-05

### The expression pattern of the BMP15 gene in follicle of different chicken breeds

LI Chunmiao<sup>1,2</sup>, LI Shoufeng<sup>1,2</sup>, ZHAO Zhenhua<sup>1,2</sup>, HUANG Huayun<sup>1,2</sup>,

Wang Qianbao<sup>1,2</sup>, HUANG Zhengyang<sup>1</sup>, XUE Longgang<sup>1</sup>

(1. Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225125;

2. Xianglong Poultry Development Co., Ltd. of Yangzhou, Yangzhou 225261)

**Abstract:** The expression pattern of BMP15 in the granular layer and membranous layer during follicle development in Huainan partridge and shaobo chicken was studied. The result showed that in granular layer, the expression pattern of BMP15 in two varieties of chicken's follicle was first increased and then decreased. The expression reached the peak at small yellow follicle and then significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). In different periods, the expression of BMP15 in the granular layer of the same grade at 24 weeks was higher than that at 43 weeks, and at small yellow follicle, the expression at 24-week was significantly higher than that at 43-week ( $P < 0.05$ ). In membranous layer, the expression of the BMP15 gene was similar to the “^” shape in two chicken breeds. The expression reached the peak at the small yellow follicle, which was significantly higher than that of other grades ( $P < 0.05$ ). The expression in the membranous layer in the same grade at 24 weeks was higher than that at 43-week. At small yellow follicle, the expression at 24-week was significantly higher than that at 43-week ( $P < 0.05$ ). The BMP15 gene in the granular layer and membranous layer of all grades follicle of Huainan partridge was higher than that of Shaobo chicken with no significant difference. The results suggested that the expression level of the BMP15 gene in follicle showed variations among different development stages, breeds and tissues and small yellow follicle was an important period for follicular development.

**Key words:** chicken; BMP15; follicular development

收稿日期: 2017-04-05

基金项目: 扬州市自然科学基金 (YZ2015104), 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-42-Z06), 江苏省科技支撑项目 (BE2015344), 江苏省农业科技自主创新基金 (CX (15) 1009) 和扬州市现代农业项目 (YZ2015041) 共同资助。

作者简介: 李春苗, 助理研究员。E-mail: cherrybcm@163.com

\* 通信作者: 黎寿丰, 研究员。E-mail: yzlsf3333@126.com

骨形态发生蛋白 15 (bone morphogenetic protein 15, BMP15), 一种多功能生长因子, 是骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 的成员之一, 属于  $\beta$ -转化生长因子 (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) 超家族的成员<sup>[1-2]</sup>。骨形态发生蛋白在心脏、神经、软骨发育、骨的形成以及卵巢与卵泡的发育起着至关重要的作用<sup>[3-5]</sup>。大量研究表明, *BMP15* 对调节颗粒细胞的增殖和分化, 卵泡的出现和形成等哺乳动物生殖至关重要的环节起决定性作用<sup>[6-9]</sup>。小鼠的 *BMP15* 在卵母细胞中特异表达, 从初级卵母细胞持续到排卵均有表达<sup>[10]</sup>。基因敲除技术证实, 敲除小鼠的 *BMP15* 会引起排卵和受精率的降低<sup>[11]</sup>。未成年的转基因小鼠过表达 *BMP15* 使初级卵泡下降和次级卵泡增长, 成年小鼠虽可正常产仔, 但闭锁卵泡的数量增加了<sup>[12]</sup>。*BMP15* 基因是诱导卵丘细胞扩增的关键因素, 用 *BMP15* 刺激表皮生长因子在小鼠卵丘细胞和表皮生长因子信号通路的下游基因的表达, 是正常卵泡扩增所必须的<sup>[13-14]</sup>。水牛 *BMP15* 的表达模式与卵丘细胞的增长期密切相关<sup>[15]</sup>。大量研究已证实 *BMP15* 在羊、斑马鱼、牛、人和猪的卵巢的卵泡发育中的作用至关重要<sup>[16-21]</sup>。研究发现鸡的 *BMP15* 在卵巢中高表达, 在整个等级卵泡成熟过程中均维持较高水平, 排卵后表达量开始下降, 在脑组织中低表达, 其他组织中不表达, 人工抑制卵巢中 *BMP15* 的作用, 发现类固醇合成急性调节蛋白减少, 因此推断 *BMP15* 对母鸡的生育力起着关键作用<sup>[22]</sup>。尽管 *BMP15* 在哺乳动物和其他动物中的生物学功能已经被确认, 但其在鸡中的生物学功能尚不清楚。目前, *BMP15* 对鸡卵泡发育的调控研究较少, 本试验选择特色地方鸡种淮南麻黄鸡和中国农业科学院家禽研究所培育的邵伯鸡母鸡为试验材料, 分析 *BMP15* 在不同品种鸡的各等级卵泡的颗粒层和膜层中的表达模式, 为深入研究 *BMP15* 对鸡卵泡发育的遗传分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

以中国地方鸡品种淮南麻黄鸡和中国农业科学院家禽研究所培育的邵伯鸡母鸡各 300 只为试验素材, 在同一饲养条件下笼养, 执行正常的免疫程序, 实施规范的饲养管理。母鸡开产后分别记录从开产至 45 周龄的产蛋数。分别于 24 周 (开产初期) 和 43 周 (产蛋后期) 产蛋后 2 h 时进行屠宰, 取出卵巢置于灭菌的 PBS 中, 按直径大小依次将卵泡分

类<sup>[23-24]</sup>, 分别采集等级前卵泡: 大白卵泡 (large white follicle, LWF, 4~6 mm)、小黄卵泡 (small yellow follicle, SYF, 6~8 mm) 和各级卵泡 F1、F2、F3、F4 和 F5。分离各级卵泡的颗粒层和膜层, 用于 RNA 提取, 每个品种在每个时间点各采集 5 个个体。

### 1.2 主要试剂和仪器

试剂为: RNA simple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒 (DP419) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, Prime Script<sup>TM</sup> RT Master Mix (Perfect Real Time) cDNA 第一链合成试剂盒, SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus) 荧光定量试剂盒均购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaRa)。仪器为: 9700PCR 仪、凝胶成像系统 (Tanon 2500)、Thermo Nanodrop 微量分光光度计和 ABI7500 Real-Time PCR System。

### 1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

RNA 提取参照天根提取试剂盒进行 (DP419, Tiangen, Beijing, China), RNA 浓度和纯度用 Thermo Nanodrop 微量分光光度计检测 ( $A_{260}:A_{280} \geq 1.8$  且  $\leq 2.0$ ), RNA 样本保存在  $-80^{\circ}\text{C}$ 。总 RNA 浓度稀释到  $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , cDNA 第 1 链的合成按照反转录试剂盒的使用说明书进行 (TaKaRa, Dalian, China),  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

表 1 *BMP15* 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers of *BMP15* used in the real time PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	长度/bp Length
<i>BMP15</i>	F: 5' -atcatcgtctccccatcgctacaacc- 3'	213
	R: 5' -ctttagaggatgctgccgtctgtgc- 3'	
<i><math>\beta</math>-actin</i>	F: 5' -gtccaccttccagcagatgt- 3'	169
	R: 5' -ataaagccatgccaatctcg- 3'	

### 1.4 荧光实时定量 PCR

采用 Q-PCR (SYBRGreen) 技术, 按照 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus) 荧光定量试剂盒的反应体系 ( $20 \mu\text{L}$ ): SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) ( $2 \times$ )  $0.4 \mu\text{L}$ , PCR Forward Primer ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.4 \mu\text{L}$ , PCR Reverse Primer ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.4 \mu\text{L}$ , cDNA 模板  $1 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O (灭菌水)  $7.8 \mu\text{L}$ 。检测 *BMP15* 在 2 个品种各级卵泡组织中的 mRNA 表达规律。以 F1 等级卵泡的表达量作为参照,  *$\beta$ -actin* 为内参基因。引物终浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , *BMP15* 及内参基因的引物见表 1。

### 1.5 数据统计分析

基因相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法计算; 其中  $\Delta C_T$  = 目的基因的  $C_T$  值 - 相应 cDNA 模板的  *$\beta$ -actin* 内参

的  $C_T$  值,  $\Delta\Delta C_T = \text{目的基因的 } \Delta C_T \text{ 值} - \text{参照基因的 } \Delta C_T \text{ 值}$ 。运用 SPSS 软件中 One-way ANOVA 分析 *BMP15* 在各级卵泡的膜层和颗粒层中的表达变化。所有数据以 Mean  $\pm$  SE 表示,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 产蛋曲线

以产蛋周为单位, 统计淮南麻黄鸡和邵伯鸡从开产至 45 周龄各周的产蛋率, 并据此绘制成产蛋曲线图 (图 1)。从图 1 可以清楚地看出, 2 个群体总的产蛋率变化趋势基本一致, 但略有差别。邵伯鸡开产较早, 17 周开产, 23 周达到产蛋高峰, 持续 7 周后开始下降, 产蛋高峰期较短; 淮南麻黄鸡 19 周开产, 24 周达到产蛋高峰, 较邵伯鸡维持较稳定的产蛋水平。

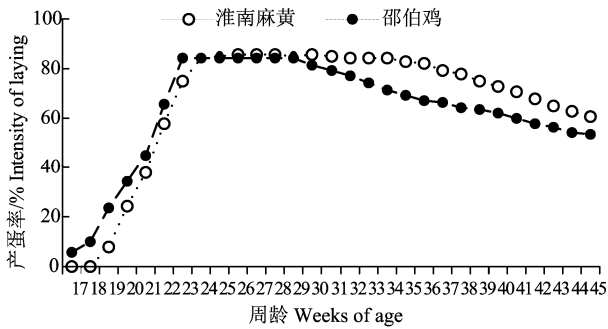


图 1 群体产蛋曲线

Figure 1 Egg laying curve of each group

### 2.2 颗粒层中 *BMP15* mRNA 的表达规律

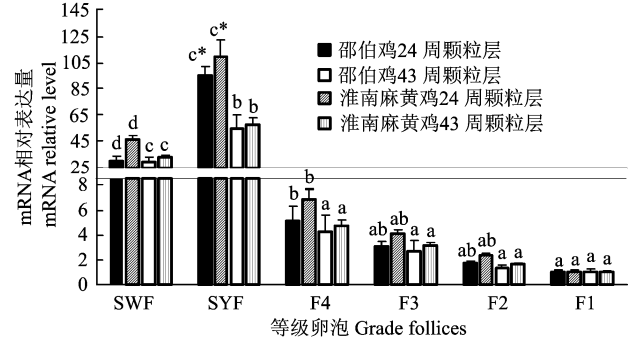
Q-PCR 结果表明, *BMP15* 在颗粒层中的表达规律 (见图 2) 表现为: *BMP15* 在 2 个不同品系不同时期不同等级卵泡颗粒层的表达模式呈先增加后降低的趋势。具体表现为: 随着卵泡的发育 *BMP15* mRNA 的表达量逐渐增加, 发育到小黄卵泡 (SYF) 时期表达量达到最高值, 显著或极显著高于其他各等级卵泡颗粒层的表达量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。之后, 随着卵泡的发育, 进入等级卵泡后, 表达量呈显著下降趋势。不同时期同一等级卵泡颗粒层中的表达基本相似, 均表现为, 24 周表达量高于 43 周, 在小黄卵泡时期颗粒层表达量均表现为 24 周显著高于 43 周 ( $P < 0.05$ )。

品种间, *BMP15* 的表达量在各级卵泡的颗粒层均表现为淮南麻黄鸡略高于邵伯鸡, 差异不显著。

### 2.3 膜层中 *BMP15* 基因 mRNA 的表达规律

从图 3 可以看出, 在淮南麻黄鸡和邵伯鸡各等级卵泡膜层中, *BMP15* 的表达均呈“低→高→低”

的趋势, 类似“ $\wedge$ ”形, 表达高峰出现在小黄卵泡 (SYF) 时期, 显著或极显著高于其他各等级卵泡的表达量 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。不同时期同一等级卵泡膜层中的表达基本相似, 均表现为, 24 周表达量高于 43 周, 在小黄卵泡 (SYF) 时期膜层表达量表现为 24 周显著高于 43 周 ( $P < 0.05$ )。

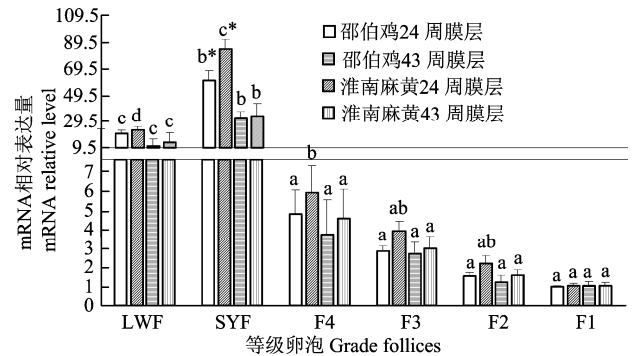


相同字母表示同一品种不同等级卵泡颗粒层的表达差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 不同字母表示同一品种不同时期差异表达显著 ( $P > 0.05$ )。“\*”表示同一品种同一等级卵泡颗粒层不同时期的表达差异显著。

Bar diagram values with the same letter are not significant ( $P > 0.05$ ), and different letters are significant ( $P < 0.05$ ) between different grades of ovarian granulosa layer in the same breed. “\*” means significant difference at the same grade of ovarian and the same breed and different ages.

图 2 *BMP15* 在鸡不同等级卵泡颗粒层中的表达

Figure 2 The expression of chicken *BMP15* in granulosa layer of different grades

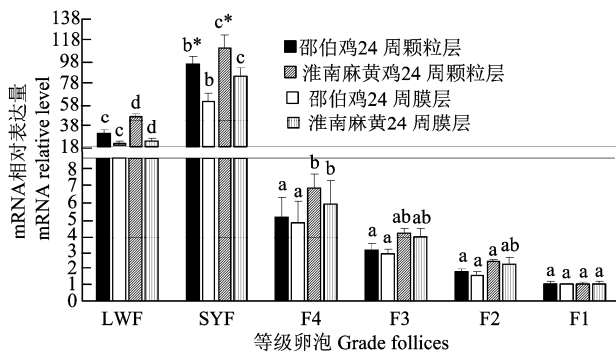


相同字母表示同一品种不同等级卵泡膜层的表达差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 不同字母表示同一品种不同时期差异表达显著 ( $P < 0.05$ )。“\*”表示同一品种同一等级卵泡膜层不同时期的表达差异显著。

Bar diagram values with the same letter are not significant ( $P > 0.05$ ), and different letters are significant ( $P < 0.05$ ) between different grades of ovarian membranous layer in the same breed. “\*” means significant difference at the same grade of ovarian and the same breed and different ages.

图 3 *BMP15* 在鸡不同等级卵泡膜层中的表达

Figure 3 The expression of chicken *BMP15* in membranous layer of different grades

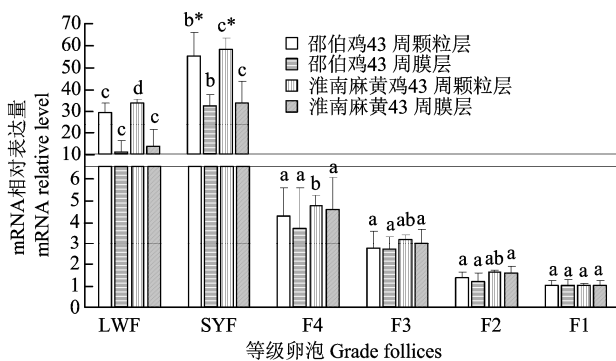


相同字母表示同一品种不同等级卵泡颗粒层的表达差异不显著 ( $P>0.05$ ); 不同字母表示同一品种不同时期差异表达显著 ( $P<0.05$ )。\*表示同一品种同一等级卵泡颗粒层和膜层在 24 周时的表达差异显著。

Bar diagram values with the same letter are not significant ( $P>0.05$ ), and different letters are significant ( $P<0.05$ ) between different grades of ovarian membranous layer in the same breed. "\*" means significant difference in granulosa layer and membranous layer at the same grade of ovarian and the same breed at 24 weeks.

图 4 24 周 *BMP15* 在鸡不同等级卵泡中的表达

Figure 4 The expression of chicken *BMP15* of different grade follicles at 24 weeks



相同字母表示同一品种不同等级卵泡颗粒层的表达差异不显著 ( $P>0.05$ ); 不同字母表示同一品种不同时期差异表达显著 ( $P<0.05$ )。\*表示同一品种同一等级卵泡颗粒层和膜层在 43 周时的表达差异显著。

Bar diagram values with the same letter are not significant ( $P>0.05$ ), and different letters are significant ( $P<0.05$ ) between different grades of ovarian membranous layer in the same breed. "\*" means significant difference in granulosa layer and membranous layer at the same grade of ovarian and the same breed at 43 weeks.

图 5 43 周 *BMP15* 在鸡不同等级卵泡中的表达

Figure 5 The expression of chicken *BMP15* of different grade follicles in 43 weeks

品种间, *BMP15* 的表达量在各级卵泡的膜层均表现为淮南麻黄鸡略高于邵伯鸡, 差异不显著。

#### 2.4 24 周 *BMP15* mRNA 的表达规律

从图 4 可以看出, 24 周时, *BMP15* 在淮南麻黄鸡和邵伯鸡各级卵泡中的表达均表现为颗粒层高

于膜层; 在小黄卵泡 (SYF) 时期, *BMP15* 在淮南麻黄鸡和邵伯鸡各级卵泡中的表达均表现为颗粒层显著高于膜层 ( $P<0.05$ )。

#### 2.5 43 周 *BMP15* mRNA 的表达规律

从图 5 可以看出, 43 周时, *BMP15* 在淮南麻黄鸡和邵伯鸡各级卵泡中的表达均表现为颗粒层高于膜层; 在小黄卵泡 (SYF) 时期, *BMP15* 在淮南麻黄鸡和邵伯鸡各级卵泡中的表达均表现为颗粒层显著高于膜层 ( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

*BMP15* 的主要生理功能是调节动物卵泡的发育, 包括促进颗粒细胞增殖、卵丘扩散、抑制颗粒细胞的凋亡和黄体化、促进卵母细胞成熟和排卵等。此外, 还参与调节颗粒细胞中孕酮等固醇类激素的生成<sup>[25-28]</sup>。Paradis 等<sup>[29]</sup>采用实时荧光定量 PCR 方法研究发现 *BMP15* 在猪的卵母细胞中高表达, 并在整个卵泡发育过程中保持相对稳定。Sun 等<sup>[30]</sup>研究发现 *BMP15* 在小鼠和猪的卵母细胞和颗粒细胞中均有表达。Han 等<sup>[31]</sup>研究发现 *BMP15* 莱芜黑鸡的各级卵泡中均有表达, 并且在直径为 4 mm 和 6~8 mm 的卵泡中表达量最高。本试验采用实时荧光定量 PCR 法检测了 *BMP15* 在淮南麻黄鸡和邵伯鸡各级卵泡的颗粒层和膜层中的表达, 发现 *BMP15* 在淮南麻黄鸡和邵伯鸡的各级颗粒层和膜层中的表达具有时间依赖性, 均表现为 24 周表达量高于 43 周表达量, 可能与 24 周时淮南麻黄鸡和邵伯鸡均已达到产蛋高峰, 而 43 周时产蛋率均已下降有关; *BMP15* 在各级卵泡的颗粒层和膜层中的表达量均表现为淮南麻黄鸡略高于邵伯鸡, 具有品种依赖性, 可能是由淮南麻黄鸡的产蛋高峰期比邵伯鸡的产蛋高峰维持时间长决定的; 24 周和 43 周时 *BMP15* 在卵泡颗粒层和膜层的表达量均表现为小黄卵泡 (SYF) 时期最高, 显著或极显著高于其他等级, 且在小黄卵泡 (SYF) 时期, *BMP15* 在淮南麻黄鸡和邵伯鸡各等级卵泡中的表达均表现为颗粒层显著高于膜层, 具有组织差异性, 以上结果表明, *BMP15* 参与了卵泡发育的调控, 且小黄卵泡时期可能是卵泡发育过程中一个重要时期, 这与 Fabre 等<sup>[32]</sup>的研究结果: 等级前卵泡的发育直接影响优势卵泡的筛选、卵泡的成熟和排卵, 并参与维持正常的产蛋规律, 处于 6~8 mm (SYF) 发育状态的卵泡是卵泡筛选中能否进入优先等级的关键点一致。综上所述, *BMP15* 对鸡的卵泡发育存在一定的时间、品种和组织差异。为进一步深入研究 *BMP15* 基因在鸡卵泡

发育过程的作用及其调控机理提供一定理论依据。

### 参考文献:

- [1] AUCLAIR S, ROSSETTI R, MESLIN C, et al. Positive selection in bone morphogenetic protein 15 targets a natural mutation associated with primary ovarian insufficiency in human[J]. Plos One, 2013, 8(10): e78199.
- [2] MULLEN M P, HANRAHAN J P, HOWARD D J, et al. Investigation of prolific sheep from UK and Ireland for evidence on origin of the mutations in BMP15 (*FecXG*, *FecXB*) and GDF9 (*FecGH*) in belclare and Cambridge Sheep[J]. Plos One, 2013, 8(1): e53172.
- [3] CHEN D, ZHAO M, MUNDY G R. Bone morphogenetic proteins[J]. Growth Factors, 2004, 22(4):205-209.
- [4] KNIGHT P G, GLISTER C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development[J]. Reproduction, 2006, 132(2):191-206.
- [5] PERSANI L, ROSSETTI R, PASQUALE E D, et al. The fundamental role of *bone morphogenetic protein 15* in ovarian function and its involvement in female fertility disorders[J]. Hum Reprod Update, 2014, 20(6):869-883.
- [6] OTSUKA F, YAO Z, LEE T, et al. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions[J]. J Biol Chem, 2000, 275(50):39523-39528.
- [7] OTSUKA F, YAMAMOTO S, ERICKSON G F, et al. Bone morphogenetic protein-15 inhibits folliclestimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression[J]. J Biol Chem, 2001, 276(14):11387-11392.
- [8] 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[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(12): 8060-8065.
- [9] LAITINEN M, VUOJOLAINEN K, JAATINEN R, et al. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis[J]. Mech Dev, 1998, 78(1): 135-140.
- [10] DUBE J L, WANG P, ELVIN J, et al. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes[J]. Mol Endocrinol, 1998, 12(12): 1809-1817.
- [11] YAN C, WANG P, DEMAYO J, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function[J]. Mol Endocrinol, 2001, 15(6): 854-866.
- [12] MCMAHON HE, HASHIMOTO O, MELLON PL, et al. Oocyte-specific overexpression of mouse bone morphogenetic protein-15 leads to accelerated folliculogenesis and an early onset of acyclicity in transgenic mice[J]. Endocrinology, 2008, 149(6): 2807-2815.
- [13] SU Y Q, WU X, O'BRIEN M J, et al. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop[J]. Dev Biol, 2004, 276(1): 64-73.
- [14] YOSHINO O, MCMAHON H E, SHARMA S, et al. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(28):10678-10683.
- [15] KATHIRVEL M, SOUNDIAN E, KUMANAN V. Differential expression dynamics of growth differentiation factor9 (*GDF9*) and bone morphogenetic factor15 (*BMP15*) mRNA transcripts during in vitro, maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) cumulus-oocyte complexes[J]. Springer Plus, 2013, 2(1):206-212.
- [16] JUENGEL J L, HUDSON N L, HEATH D A, et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep[J]. Biol Reprod, 2002, 67(6): 1777-1789.
- [17] TAN Q, ZAGRODNY A, BERNAUDO S, et al. Regulation of membrane progesterin receptors in the zebrafish ovary by gonadotropin, activin, TGF-beta and BMP-15[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 312(1): 72-79.
- [18] HOSOE M, KANEYAMA K, USHIZAWA K, et al. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2011, 9(1): 33-41.
- [19] PENG J, LI Q, WIGGLESWORTH K, et al. Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(8): E776-E785.
- [20] ZHAI B, LIU H, LI X, et al. BMP15 prevents cumulus cell apoptosis through CCL2 and FBN1 in porcine ovaries[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32(2): 264-278.
- [21] LIN Z L, LI Y H, XU Y N, et al. Effects of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on the in vitro maturation of porcine oocytes[J]. Reprod Domest Anim, 2014, 49(2): 219-227.
- [22] ELIS S, DUPONT J, COUTY I, et al. Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary[J]. J Endocrinol, 2007, 194(3): 485-497.
- [23] LIU H Y, ZHANG C Q. Effects of daidzein on messenger ribonucleic acid expression of gonadotropin receptors in chicken ovarian follicles[J]. Poultry Sci, 2008, 87(3): 541-545.
- [24] ONAGBESAN O, BRUGGEMAN V, DECUYPERE E. Intra-ovarian growth factors regulating ovarian function in avian species: a review[J]. Anim Reprod Sci, 2009, 111(2): 121-140.
- [25] PAULINI F, MELO E O. The role of oocyte-secreted factors *GDF9* and *BMP15* in follicular development and oogenesis[J]. Reprod Domest Anim, 2011, 46(2): 354-361.
- [26] PRAMOD R, SHARMA S, SINGHI A, et al. Differential ovarian morphometry and follicular expression of BMP15, GDF9 and BMPRI1B influence the prolificacy in goat[J]. Reprod Domest Anim, 2013, 48(5): 803-809.
- [27] MOORE R K, ERICKSON G F, SHIMASAKI S. Are BMP- 15 and GDF- 9 primary determinants of ovulation quota in mammals?[J]. Trends Endocrin Met, 2004, 15(8): 356-361.
- [28] MONESTIER O, SERVIN B, AUCLAIR S, et al. Evolutionary origin of bone morphogenetic protein 15 and growth and differentiation factor 9 and differential selective pressure between mono- and polyovulating species[J]. Biol Reprod, 2014, 91(4): 1-13.
- [29] PARADIS F, NOVAK S, MURDOCH G K, et al. Temporal regulation of *BMP2*, *BMP6*, *BMP15*, *GDF9*, *BMPRI1A*, *BMPRI1B*, *BMPRI2* and *TGFBR1* mRNA expression in the oocyte, granulosa and theca cells of developing preovulatory follicles in the pig[J]. Reproduction. 2009, 138(1): 115-129.
- [30] SUN RZ, LEI L, CHENG L, et al. Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles[J]. J Mol Histol, 2010, 41(6): 325-332.
- [31] HAN H, LEI Q, ZHOU Y, et al. Association between BMP15 gene polymorphism and reproduction traits and its tissues expression characteristics in chicken[J]. Plos One, 2015, 10(11): e0143298.
- [32] FABRE S, PIERRE A, MULSANT P, et al. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2006, 4(1):1-12.