

郭保平, 牛亚茹, 徐明龙, 等. *AMHR2* 新型转录本 *AMHR2-SV1* 的鉴定及其在大鼠组织中的表达[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 394-400.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.027

AMHR2 新型转录本 *AMHR2-SV1* 的鉴定及其在大鼠组织中的表达

郭保平, 牛亚茹, 徐明龙, 徐银学

(南京农业大学动物科学技术学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 本研究旨在鉴定抗苗勒氏管激素受体 2 (*AMHR2*) 一种新的转录本, 确定其在大鼠组织中的表达情况。采用 TRIzol 法提取组织总 RNA; 运用 RT-PCR 和克隆测序技术分析 *AMHR2* 基因的可变剪接体及其在大鼠各组织器官中的表达差异, 同时利用 NCBI ORF Finder 识别剪接体序列阅读框, 运用 ExPASy-ProtParam 和 Conserved domains 软件分别预测剪接体氨基酸构成及其性质和剪接体保守序列。*AMHR2-SV1* 是 *AMHR2* 的一种新型转录本, 命名为 *AMHR2-splice variant (AMHR2-SV1)*, 与 *AMHR2* 参考序列比较, 缺失第 10 外显子 137 bp。利用 NCBI ORF Finder 和 ExPASy-ProtParam, 预测 *AMHR2-SV1* 编码 429 个氨基酸残基, 其编码的蛋白质分子量为 45 990.7。Conserved domains 在线软件分析表明: *AMHR2-SV1* 蛋白序列比完整 *AMHR2* 蛋白序列缺少 128 个氨基酸, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域不完整。检测结果表明, 大鼠组织中均存在 *AMHR2* 和 *AMHR2-SV1* 两个转录本。在肝、脾、肺、肾、肾上腺和子宫组织中 *AMHR2* 表达量均高于 *AMHR2-SV1*, 差异达到显著水平; 两种转录本在不同组织中表达趋势相同, 卵巢中表达量最高, 心脏中次之, 其他组织表达量均显著低于卵巢和心脏。

关键词: *AMHR2*; *AMHR2-SV1*; 新型转录本; 表达图谱

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)02-0394-07

AMHR2-SV1, a novel transcript of *AMHR2* and its expression in rat tissues

GUO Bao-ping, NIU Ya-ru, XU Ming-long, XU Yin-xue

(College of Animal Science and Technology/Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A splice variant of anti-Müllerian hormone receptor 2 (*AMHR2*), *AMHR2-splice variant (AMHR2-SV1)*, was identified by RT-PCR and sequencing techniques. *AMHR2-SV1* contains an open reading frame of 76–1 365 bp, encoding 429 amino acids. Sequence alignment revealed an exon 10 (137 bp) deletion in *AMHR2-SV1*. Protein *AMHR2-SV1* has a molecular mass of 45 990.7. Compared to the protein sequence of *AMHR2*, the protein sequence of *AMHR2-SV1* missed 128 amino acids, and lost part of the serine/threonine kinase domain. Both *AMHR2* and *AMHR2-SV1* transcripts were detected in most rat tissues and organs, and the mRNA for the spliced variant was relatively less abundant than *AMHR2* mRNA in liver, spleen, lung kidney, adrenal and

uterus. *AMHR2* and *AMHR2-SV1* presented the highest expressions in ovary, the moderate expression in heart and the lowest in other tissues and organs.

Key words: anti-Müllerian hormone receptor 2 (*AMHR2*); *AMHR2-SV1*; novel transcript; expression profile

收稿日期: 2014-08-27

基金项目: 南京农业大学科技发展基金项目 (0606F0025)

作者简介: 郭保平 (1988-), 男, 山西太原人, 硕士研究生, 研究方向为动物遗传育种与繁殖。(Tel) 18761867090; (E-mail) 2012105038@njau.edu.cn

通讯作者: 徐银学, (E-mail) xuyinxue@njau.edu.cn

抗苗勒氏管激素 II 型受体 (anti-müllerian hormone receptor II, AMHR2), 也叫苗勒管抑制物 (müllerian inhibiting substance type II receptor, MIS II R), 属于转化生长因子 β II 型受体 (T β R II) 之一, 最初分别由 di Clemente N 和 Baarends 等所在的两个实验室用不同的方法于 1994 年克隆获得^[1-2]。随后, Imbeaud 等分离出人类抗苗勒氏管激素 II 型受体基因, 定位于 12 号染色体, 由 11 个外显子组成, 主要编码三个功能区: 胞外区 (第 1~3 外显子)、疏水跨膜区 (第 4 外显子) 和胞内区 (第 5~11 外显子), 属于跨膜丝氨酸/苏氨酸受体激酶, 在抗苗勒氏管激素受体靶器官特异性表达, 即苗勒氏管^[3-4]。最新研究结果表明^[5], 在哺乳动物、鱼类和家禽中都成功克隆出 AMHR2 基因, 而且在人、兔子、大鼠和小鼠中都发现 AMHR2 存在可变剪接体。其中小鼠中发现 AMHR2 两种新可变剪接体, 与参考序列比对, 胞内结构域部分片段缺失, 对抗苗勒氏管激素信号转导发挥抑制作用^[6]。同时在兔中也发现存在不同的可变剪接体, 但并未做相关的功能和结构分析^[2]。

有文献报道 TGF- β (Transforming growth factor- β) 信号通路的异常与肿瘤的发生、发展及转移等密切相关^[7-9]。作为一个肿瘤抑制通路, 通路中任意元件的异常都可以引起信号转导紊乱, 都可能使细胞逃避 TGF- β 介导的生长抑制效应, 导致肿瘤发生。在 TGF- β 诱导的信号转导中, T β R II 胞内段激酶区的缺失可阻断 TGF- β 的生长抑制作用, 但其促纤维化作用则不受影响, 说明 T β R II 激酶区是介导 TGF- β 的生长抑制作用所必需的^[10]。

在本试验中, 我们鉴定了大鼠 AMHR2 基因一种新的可变剪接体及其在不同组织中的表达, 并对其进行了生物信息学和功能预测分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 取 21 d 大鼠心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、子宫和卵巢组织样品 ($n=3$), -80°C 液氮中保存备用。

1.1.2 主要试剂 琼脂糖由上海生工生物工程技术服务有限公司提供; AXYGEN DNA 凝胶回收试剂盒购自美国 Axygen 公司; 反转录试剂盒、实时荧光

定量试剂盒 (TaKaRa) 购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 NCBI 中提交的大鼠 AMHR2 基因 mRNA 序列 (GenBank NO. NM 030998.1) 和 β -actin 基因 mRNA 序列 (GenBank NO. NM_031144.3), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物并由上海英骏生物技术工程有限公司合成。

1.2.2 RNA 提取及反转录 根据 Trizol 试剂盒说明书提取大鼠心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、子宫和卵巢组织总 RNA, 0.01 g/ml 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度计测定浓度后, 参照 Takara 反转录试剂盒说明书合成第 1 链 cDNA, -20°C 保存备用。

1.2.3 大鼠 AMHR2 基因可变剪接体的鉴定 根据大鼠 AMHR2 基因 mRNA 参考序列 (GenBank NO. NM 030998.1) 设计 3 对引物, 分别命名为 1F/R、2F/R、3F/R (表 1)。以合成的大鼠卵巢组织 cDNA 为模板扩增 AMHR2 基因的编码区, 同时以 β -actin 为内参基因。PCR 反应体系为 $20\text{ }\mu\text{l}$; 包括 $2\times\text{ Taq PCR Master Mix } 10\text{ }\mu\text{l}$, $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 $0.5\text{ }\mu\text{l}$, $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ cDNA 模板 $1\text{ }\mu\text{l}$, $\text{ddH}_2\text{O } 8\text{ }\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件: 95°C 预变性 5 min ; 95°C 变性 30 s , 退火 30 s , 72°C 延伸 36 s , 35 个循环, 退火温度见表 1; 最后 72°C , 7 min , 4°C 保存。PCR 产物经 0.01 g/ml 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 Axygen 凝胶回收试剂盒回收特异性目的片段, 将目的片段连接到 pEASY-T3 载体 (北京全式金生物技术有限公司生产), 转化到 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中。菌液经 PCR 鉴定阳性单克隆, 送上海英俊生物技术有限公司测序, 测序结果用 DNAMAN 进行比对分析。

1.2.4 生物信息学分析 使用 DNAMAN 和 DNASTAR 对剪接体核酸和蛋白序列进行拼接、比对和分析; 剪接体序列阅读框架的识别运用 NCBI 中的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 软件; 剪接体氨基酸构成及性质预测运用 ExPASy-ProtParam 软件 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>); 剪接体保守结构域预测运用 Conserved domains 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。

表 1 目的基因 *AMHR2* 和内参基因 *β-actin* 的 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences of target gene *AMHR2* and reference gene *β-actin*

引物	序列(5'→3')	退火温度(℃)	产物长度(bp)	扩增区域
1F/R	GAAGCGTTGACGAGGCTAGC/TGACCCACCTTGCACCTCTAC	60.0	597	5'UTR/exon5
2F/R	CTGTAGAGTGCAAGGTGGGTC/GCCAGGGAGTACCAAGGCAA	64.0	560	Exon5/exon8
3F/R	GCCTTGCCCTTGCTACTCCC/AACAGTGGCACTTACAGGCT	60.0	642	Exon8/exon11
4F/R	GGCTTATGAGGCAGAACTGGG/AGCCACCTGAGGATAAGCCA	60.0	229	Exon10/exon11
5F/R	TGCCTTGGCCCCTACTCAAC/GGTCCAGGCCTCAAATCGGA	60.0	198	Exon8/exon11
β-actin	CACCCGCGAGTACAACCTTC/CCCATACCCACCATCACACC	60.4	207	

1.2.5 *AMHR2* 及其剪接体组织表达谱分析 根据大鼠 *AMHR2* 基因 mRNA 参考序列 (GenBank NO. NM 030998.1) 设计特异性引物 4F/R 和 5F/R (引物位置见图 1), 分别定量参考序列和新转录本, 以 *β-actin* 为内参基因, 引物序列见表 1。通过 RT-PCR 和 Real-time RT-PCR 技术分别检测可变剪接体的组织分布和相对表达量。RT-PCR 反应体系为: 模板 cDNA 1 μl, 2×Premix™ Taq 10 μl, 上下游引物各 0.5 μl, 灭菌蒸馏水 8 μl。反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 退火 30 s, 72℃ 延伸 12 s, 35 个循环, 退火温度见表 1; 最后 72℃, 7 min, 4℃ 保存。Real-time RT-PCR 反应体系为: 模板 cDNA 2 μl, 2×SYBR Premix Ex Taq 10 μl, 上下游引物各 0.4 μl, ROX 0.4 μl, 灭菌蒸馏水 6.8 μl。反应程序: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 34 s, 40 个循

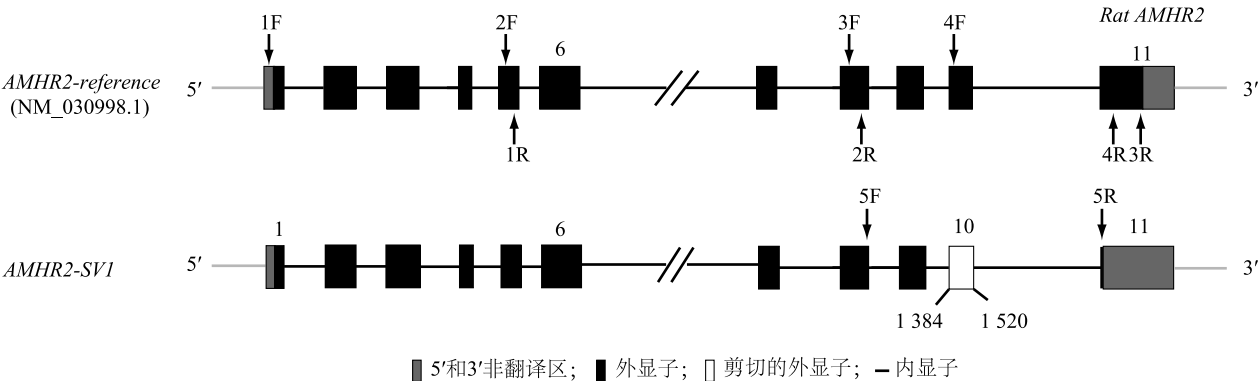
环; 溶解曲线: 95℃ 15 s, 60℃ 上升至 95℃。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 计算公式: 相对基因表达量 = $2^{-(\Delta C_t \text{样品} - \Delta C_t \text{对照})}$ 。

1.2.6 数据统计与分析 将所得数据经 Excel 2003 初步处理之后, 采用 SPSS19.0 进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和独立样本 *t* 检验 (independent-samples *t*-test)。

2 结果

2.1 大鼠 *AMHR2* 可变剪接体的鉴定

大鼠 *AMHR2* 有 11 个外显子组成, 编码蛋白由 557 个氨基酸组成。本试验检测到 1 个新的转录本, 命名为 *AMHR2-SV1*。通过序列比对发现, *AMHR2-SV1* 是缺失第 10 外显子 (137 bp) 的新转录本 (图 1, GenBank No. KJ923229)。



箭头所指为引物位置。
图 1 大鼠 *AMHR2* 基因结构和可变剪接示意图

Fig. 1 Diagram depicting the genomic structure and splice variant of rat *AMHR2* gene

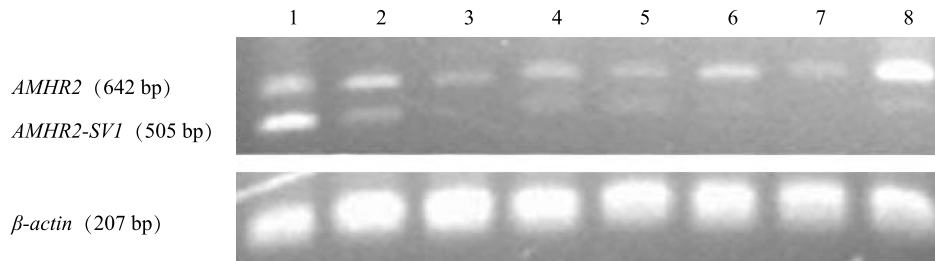
2.2 大鼠 *AMHR2* 基因在不同组织的表达

用 RT-PCR 和 Real-Time PCR 方法分析了 *AM-*

HR2 基因参考转录本和新转录本 *AMHR2-SV1* 在大鼠心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、子宫和卵巢组织中的表

达。结果显示,在检测的大鼠组织中均存在 *AMHR2* 和 *AMHR2-SV1* 两个转录本(图2);在肝、脾、肺、肾、肾上腺和子宫组织中 *AMHR2* 表达量均高于

AMHR2-SV1,差异达到显著水平;两种转录本在不同组织中表达趋势相同,卵巢中表达量最高,心脏中次之,其他组织表达量均显著低于卵巢和心脏(表2)。



图中1-8泳道分别是心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、子宫、卵巢。

图2 大鼠 *AMHR2* 基因不同转录本在各个组织中的 RT-PCR 电泳结果

Fig.2 Expressions of *AMHR2* and *AMHR2-SV1* in different tissues and organs detected by RT-PCR

表2 大鼠 mRNA 在不同组织中的相对表达量

Table 2 The relative expression of mRNA in different tissues of rat

转录本	组织							
	心	肝	脾	肺	肾	肾上腺	子宫	卵巢
<i>AMHR2</i>	0.220 0± 0.050 0b	0.028 0± 0.005 4c	0.015 0± 0.001 3c	0.031 0± 0.006 0c	0.055 0± 0.006 3c	0.110 0± 0.009 1c	0.077 0± 0.003 1c	1.260 0± 0.042 0a
<i>AMHR2-SV1</i>	0.350 0± 0.057 0b	0.007 2± 0.000 9d	0.004 0± 0.000 4d	0.007 4± 0.001 6d	0.021 0± 0.000 1d	0.028 0± 0.001 8c	0.023 0± 0.000 8d	1.070 0± 0.095 0a

同一行中不同小写字母表示不同组织中表达量差异显著。

2.3 *AMHR2* 和 *AMHR2-SV1* 的生物信息学预测

利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 在线软件预测发现,大鼠 *AMHR2-SV1* 转录本的开放阅读框为76~1 365 bp,编码429个氨基酸,通过序列比对发现,*AMHR2-SV1* 是缺失第10外显子(137 bp)。利用 ORF finder 工具在线翻译新转录本序列,发现由于外显子缺失导致终止密码子提前出现,翻译提前终止,*AMHR2-SV1* 蛋白序列比完整 *AMHR2* 蛋白序列缺少128个氨基酸(图3)。

ExPASy-ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 软件分析结果表明剪接体 *AMHR2-SV1* 蛋白的分子量为45 990.7,等电点为5.89;预测剪接体 *AMHR2-SV1* 蛋白的不稳定系数(Instability index)为49.40(>40为不稳定蛋白);氨基酸残基亲疏水性总和(Grand average of hydropathicity)是-0.106,表明该蛋白质具有亲水性,且不稳定。

3 讨论

mRNA 前体的选择性剪接可以改变编码区序列,产生多种蛋白质,从而改变基因的功能。据报道,脊椎动物中可变剪接被认为是蛋白质多样性和基因表达复杂程度产生的重要原因^[11-12]。

早在1994年,di Clemente N等以兔子胚胎卵巢DNA文库为模版成功克隆出 *AMHR2* 基因,并发现其有两种不同的转录本,但并未对其信号转导特征和表达模式进行研究^[1]。而最新研究结果发现,小鼠 *AMHR2* 存在两种可变剪接体(*Amhr2Δ2* 和 *Amhr2Δ9/10*),对 AMH 信号转导有明显的负性抑制作用^[10],其中 *Amhr2Δ9/10* 由于第9、10外显子缺失,导致胞内激酶结构域部分缺失。本试验发现一个新的 *AMHR2* 转录本,并将其命名为 *AMHR2-SV1*,GenBank 登录号为 KJ923229。分析 *AMHR2* 和 *AMHR2-SV1* 两种转录本在大鼠各组织的表达情况,发现在

大鼠组织中(包括心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、子宫和卵巢)均检测到 *AMHR2* 和 *AMHR2-SV1* 两种转录本,且除心脏组织以外,*AMHR2* 表达量均高于 *AMHR2-SV1*;

此外,两种转录本在不同组织中表达趋势相同,卵巢表达量最高,心脏次之,其他组织表达量均显著低于卵巢和心脏。

A

AMH2-reference	1	MLGTLGLWTLLPAAAQVSPNRRTCFFVFEAPGVRGSKTKLGEVVDAGPGPPKGIRCLYSHCT	60
AMHR2-SV1		MLGTLGLWTLLPAAAQVSPNRRTCFFVFEAPGVRGSKTKLGEVVDAGPGPPKGIRCLYSHC	
AMH2-reference	61	CFGIWNLTHGRAQVEMQGCGLDSDEPGCESLHCDPVRAHPSPSSTLFTCSCGTDFCNANY	120
AMHR2-SV1		CFGIWNLTHGRAQVEMQGCGLDSDEPGCESLHCDPVRAHPSPSSTLFTCSCGTDFCNANY	
AMH2-reference	121	SHLPPSGNRGAPGPQEPQATPGGPIWMAQLLLGVFLVLLLSIIILALLQRKACRVQGGSD	180
AMHR2-SV1		SHLPPSGNRGAPGPQEPQATPGGPIWMAQLLLGVFLVLLLSIIILALLQRKACRVQGGSD	
AMH2-reference	181	PEPEPGSGGDCSEELPELAELRFSQVIQEGGHAVVWAGRLQGEMVAIKAFPPRAVAQFRA	240
AMHR2-SV1		PEPEPGSGGDCSEELPELAELRFSQVIQEGGHAVVWAGRLQGEMVAIKAFPPRAVAQFRA	
AMH2-reference	241	ERAVYQLLGLQHNHIVRFITAGQGGPGPLPSGPLLVLVLELYPKGSLCHYLTQYTSDWGSSL	300
AMHR2-SV1		ERAVYQLLGLQHNHIVRFITAGQGGPGPLPSGPLLVLVLELYPKGSLCHYLTQYTSDWGSSL	
AMH2-reference	301	RMALSLAEGLAFLHGERWQDGQYKPGIAHRDLSSQNVLIREDRSCAIGDLGLALVLPGLA	360
AMHR2-SV1		RMALSLAEGLAFLHGERWQDGQYKPGIAHRDLSSQNVLIREDRSCAIGDLGLALVLPGLA	
AMH2-reference	361	QPPALAPTQPRGPAAILEAGTQRYMAPELLDKTLDLQDWGTALQRADVLSALLWEILS	420
AMHR2-SV1		QPPALAPTQPRGPAAILEAGTQRYMAPELLDKTLDLQDWGTALQRADVLSALLWEILS	
AMH2-reference	421	RCSDLRPDHRPPFQLAYEAEELGNSNPACELWALAVAERKRPNIPSSWSCSATDPRGLRE	480
AMHR2-SV1		RCSDLRPGP*-----	
AMH2-reference	481	LLEDWDADPEARLTAECVQQLAALAYPVASSFPESCQGPCENCPAAPASAAFPSCR	540
AMHR2-SV1		-----	
AMH2-reference	541	QQSSCLLSVQQGSGSKS* 557	
AMHR2-SV1		-----	

B

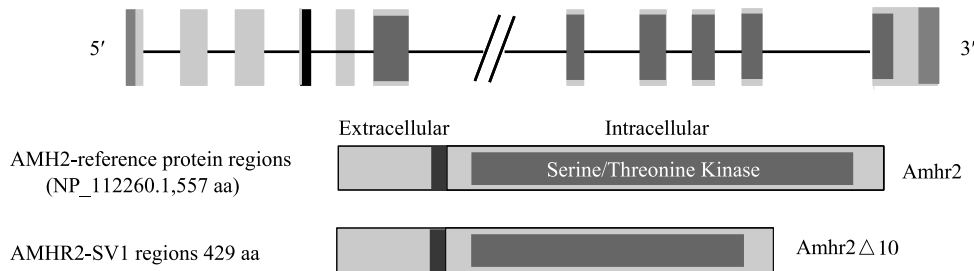


图3 *AMHR2* 参考转录本与 *AMHR2-SV1* 蛋白序列比对结果 (A) 及蛋白结构示意图 (B)

Fig. 3 Alignment of predicted amino acid sequence of *AMHR2*-reference protein and *AMHR2-SV1* (A) and their sketch maps of the proteins (B)

与 *AMHR2* 相比, *AMHR2-SV1* 转录本实质上是一种截短型的 *AMHR2*, 由于选择性剪接导致终止密码子提前出现, 其编码 429 个氨基酸残基。运用 Conserved domains 在线软件分析剪接体 *AMHR2-SV1* 蛋白的保守结构发现: 与 *AMHR2* 相比, *AMHR2-SV1* 蛋白胞内结构域变短, 没有完整的胞内丝氨酸/苏氨酸受体结构域。

TGF-β 家族通过与具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的细胞表面受体结合而引发细胞效应。细胞的恶性转化常与 *TGF-β* 受体的表达降低或失活密切相关^[13]。有研究者发现在头颈部鳞状细胞癌细胞株的细胞膜上 *TβR II* 丝氨酸/苏氨酸激酶中高度保守的 XI 亚区内第 526 (谷氨酸→谷氨酰胺) 号残基的错义突变 (E526Q), 明显降低了丝氨酸-苏氨酸激酶的

活性,从而阻断了 TGF- β 的信号转导,阻断了对细胞的生长抑制作用^[14]。眼睛黑色素瘤研究中,存在 3p22 的杂合性丢失和 *TBR II* 表达丢失^[15]。胃癌中存在的 DNA 错配修复系统不完善,经常发生复制错误,基因不稳定性与位于 *TBR II* 第三外显子的一个 10 碱基对的聚腺嘌呤序列发生移码突变,产生一个截短型的受体,此受体缺乏丝氨酸/苏氨酸激酶结构域^[16]。

AMH 蛋白通过与 T β R I 和 T β R II 复合物结合发挥生物学效应^[17-19],是为数不多的抑制卵泡发育的卵巢局部调控因子之一^[20]。AMHR2 胞浆区内丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域,具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的活性,受体激活后作用于下游信号转导分子 Smad 中介蛋白形成异源寡聚体将 AMH 信号转导至核内,进而核内 Smad 寡聚体作为转录因子直接与 DNA 作用,与其他转录因子及活化因子相互作用,对 AMH 信号的转录产生应答,调节相应靶基因的转录,从而控制靶器官组织细胞的生长、分化、凋亡,以表现不同的生物学效应^[21-24]。对河豚(红鳍东方鲀)SD 基因位点的连锁和关联映射分析发现该基因存在一个 SNP (C/G)位点,该位点突变改变了 AMHR2 丝氨酸/苏氨酸激酶区内第 384 个氨基酸残基(组氨酸 \rightarrow 天冬氨酸),从而决定了河豚的性别分化^[25]。AMHR2 跨膜结构域与胞内结构域位点突变会导致男性持续性苗勒管综合征^[26];同时,有研究表明,AMHR2 多态性在多囊卵巢综合征患者中发生的比率要高于普通患者,而卵巢 AMH 升高是多囊卵巢综合征发生的重要原因,因此,AMHR2 基因多态性是否会影响 AMH 信号转导和卵巢功能,以及对治疗多囊卵巢综合征、卵巢癌等妇科癌症的临床意义显得越来越重要。

新转录本 AMHR2-SV1 是否会对 AMH 信号转导产生抑制作用,还有待进一步研究。在后期的试验中,可以通过构建 AMHR2-SV1 表达载体,进一步确定 AMHR2-SV1 编码蛋白的生物学效应,同时对可变剪接体产生的机制做进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] DI CLEMENTE N, WILSON C, FAURE E, et al. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone[J]. Mol Endocrinol, 1994, 8(8): 1006-1020.
- [2] BAAREND S W M, VAN HELMOND M J, POST M, et al. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct[J]. Development, 1994, 120(1): 189-197.
- [3] IMBEAUD S, FAURE E, LAMARRE I, et al. Insensitivity to anti-mullerian hormone due to a mutation in the human anti-mullerian hormone receptor[J]. Nat Genet., 1995, 11(4): 382-388.
- [4] BELVILLE C, MARECHAL J D, PENNETIER S, et al. Natural mutations of the anti-Mullerian hormone type II receptor found in persistent Mullerian duct syndrome affect ligand binding, signal transduction and cellular transport[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(16): 3002-3013.
- [5] CUTTING A D, AYERS K, DAVIDSON N, et al. Identification, expression, and regulation of anti-Mullerian hormone type-II receptor in the embryonic chicken gonad[J]. Biol Reprod, 2014, 90(5): 106.
- [6] IMHOFF F M, YANG D, MATHEW S F, et al. The type 2 anti-Mullerian hormone receptor has splice variants that are dominant-negative inhibitors[J]. FEBS Lett, 2013, 587(12): 1749-1753.
- [7] 边 菁. TGF- β 信号中 TGF- β R II 的突变对膀胱癌侵袭转移的影响及其机制[D]. 武汉:华中科技大学, 2011.
- [8] BAKKUM-GAMEZ J N, ALETTI G, LEWIS K A, et al. Mullerian inhibiting substance type II receptor (MISIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers[J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(1): 141-148.
- [9] MEULMEESTER E, TEN D P. The dynamic roles of TGF-beta in cancer[J]. J Pathol, 2011, 223(2): 205-218.
- [10] BRUCE D L, SAPKOTA G P. Phosphatases in SMAD regulation [J]. FEBS Lett, 2012, 586(14): 1897-1905.
- [11] 郭 芳,罗国静,鞠志花,等. SPEF2 基因可变剪接体和功能性 SNP 鉴定及其与公牛精液性状的相关性研究[J]. 南京农业大学学报, 2014, 18(3): 119-125.
- [12] GRAVELEY B R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world[J]. Trends Genet, 2001, 17(2): 100-107.
- [13] GUO W, DONG Z, GUO Y, et al. Concordant repression and aberrant methylation of transforming growth factor-beta signaling pathway genes occurs early in gastric cardia adenocarcinoma[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(10): 9453-9462.
- [14] XIE W, BHARATHY S, KIM D, et al. Frequent alterations of Smad signaling in human head and neck squamous cell carcinomas: a tissue microarray analysis[J]. Oncol Res, 2003, 14(2): 61-73.
- [15] MYATT N, ARISTODEMOU P, NEALE M H, et al. Abnormalities of the transforming growth factor-beta pathway in ocular melanoma[J]. J Pathol, 2000, 192(4): 511-518.
- [16] JAKOWLEW S B. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(3): 435-457.
- [17] LOWERY J W, DE CAESTECKER M P. BMP signaling in vascular development and disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev,

- 2010, 21(4): 287-298.
- [18] SHI Y, MASSAGUE J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus[J]. Cell, 2003, 113(6): 685-700.
- [19] ANTONEN M, FARKKILA A, TAURIALA H, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits growth of AMH type II receptor-positive human ovarian granulosa cell tumor cells by activating apoptosis[J]. Lab Invest, 2011, 91(11): 1605-1614.
- [20] 蒋香菊, 吴阳升, 林嘉鹏, 等. 绵羊 *AMH* 基因的克隆, 序列分析与原核表达[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(6): 1386-1392.
- [21] KEDEM A, HOURVITZ A, YUNG Y, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) downregulation in late antral stages is impaired in PCOS patients. A study in normo-ovulatory and PCOS patients undergoing in vitro maturation (IVM) treatments[J]. Gynecol Endocrinol, 2013, 29(7): 651-656.
- [22] KOTANIDIS L, ASIMAKOPOULOS B, NIKOLETTOS N. Association between AMH, oocyte number and availability of embryos for cryopreservation in IVF[J]. In Vivo, 2013, 27(6): 877-880.
- [23] PEIGNE M, DECANTER C. Serum AMH level as a marker of acute and long-term effects of chemotherapy on the ovarian follicular content: a systematic review[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2014, 12: 26.
- [24] JOSSO N, DI CLEMENTE N. Serine/threonine kinase receptors and ligands[J]. Curr Opin Genet Dev, 1997, 7(3): 371-377.
- [25] KAMIYA T, KAI W, TASUMI S, et al. A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu)[J]. PLoS Genet, 2012, 8(7): e1002798.
- [26] GEORGOPOULOS N A, KARAGIANNIDOU E, KOIKA V, et al. Increased frequency of the anti-mullerian-inhibiting hormone receptor 2 (AMHR2) 482 A>G polymorphism in women with polycystic ovary syndrome: relationship to luteinizing hormone levels[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(11): E1866-E1870.

(责任编辑:陈海霞)