

绵羊卵母细胞 3 种体外培养方式下外源添加血管内皮生长因子对 FLT-1 表达的影响

曹 忻¹, 邹云龙², 陆会宁², 高丹丹², 周 平³, 石国庆³, 杨具田^{2*}

(1. 西北民族大学实验教学部, 兰州 730030; 2. 西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030;

3. 新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 石河子 832000)

摘 要: 本研究旨在探究外源添加血管内皮生长因子(VEGF)对绵羊卵母细胞体外成熟过程中 FLT-1 表达的影响。采用 3 种不同的体外成熟培养方式: 裸卵单独培养、颗粒细胞与裸卵共培养以及卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocytes complexes, COCs)培养, 外源添加 5 ng · mL⁻¹ 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)为试验组, 不添加为对照组, 采用 qPCR、Western blot 分别检测绵羊卵母细胞及颗粒细胞中 FLT-1 mRNA 和蛋白表达水平。结果表明: 1) 3 种不同培养方式下, 无论是否添加 VEGF, 颗粒细胞与卵母细胞中均能检测到 FLT-1 mRNA 和蛋白表达。添加 VEGF 能极显著降低共培养试验组 12、16 和 20 h 以及 COCs 试验组 4、8、12、16 和 24 h 颗粒细胞 FLT-1 mRNA 表达($P < 0.01$), 能极显著降低共培养试验组 12、20 和 24 h 以及 COCs 试验组 4、8 和 12 h 卵母细胞 FLT-1 mRNA 表达($P < 0.01$), 但会极显著增加裸卵试验组 4~24 h 卵母细胞 FLT-1 mRNA 表达($P < 0.01$)。2) 添加 VEGF 能够极显著降低共培养试验组和 COCs 试验组中颗粒细胞 FLT-1 蛋白 4~12 h 的表达量($P < 0.01$), 共培养试验组和 COCs 试验组中颗粒细胞 FLT-1 蛋白表达呈波动性下降趋势。COCs 对照组和试验组颗粒细胞中 FLT-1 蛋白表达量在各时间点均高于同期共培养试验组。3) 3 种不同培养方式中, 除裸卵试验组在 20~24 h 有一个急剧升高外, 其余组中卵母细胞 FLT-1 蛋白表达量总体均呈波动性下降趋势。综上表明, 卵母细胞和颗粒细胞中存在 FLT-1 的自分泌和旁分泌, 卵母细胞中 FLT-1 mRNA 的表达与外围颗粒细胞的存在与否、数量多少以及包裹方式息息相关; 在体外培养环境下, 添加 VEGF 有效地激活了 FLT-1 mRNA 表达, 但同时结合 FLT-1 蛋白以促进卵母细胞成熟的生物学效应, 从而减少了 FLT-1 蛋白的表达。

关键词: 绵羊; 卵母细胞; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体 1

中图分类号: S826.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)09-1889-10

The Effects of Adding Exogenous VEGF on FLT-1 Expression during the Process of Ovine Oocytes Maturation *in vitro* in Three Different Ways

CAO Xin¹, ZOU Yun-long², LU Hui-ning²,

GAO Dan-dan², ZHOU Ping³, SHI Guo-qing³, YANG Ju-tian^{2*}

(1. *Experimental Teaching Department, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China;*

2. *Life Science and Engineering College of Northwest University for Nationalities, Lanzhou*

730030, China; 3. *Institute of Animal Science, Xinjiang Academy of Agriculture and*

Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

Abstract: The purpose of this research was to investigate the effect of exogenously added VEGF on the expression of the FLT-1 during the process of ovine oocytes maturation *in vitro*. Three different *in vitro* maturation culture methods were adopted: naked oocytes separate cultivation,

收稿日期: 2018-04-08

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(1610RJZA104); 中央高校专项基金项目(31920160004; 31920170172)

作者简介: 曹 忻(1978-), 女, 宁夏人, 副教授, 博士后, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: caoxin-juliet@163.com, Tel: 0931-4512969

* 通信作者: 杨具田, 教授, E-mail: jtyang988@163.com

granule cells with naked oocytes co-cultivation and cumulus-oocytes complexes (COCs) cultivation. Treatment groups were adding exogenous $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ vascular endothelial growth factor (VEGF) while control groups were not. The FLT-1 mRNA and protein expression levels in both ovine oocytes and granule cells were detected by qPCR and Western blot, respectively. The results indicated that: 1) Adding VEGF could extremely significantly reduce the FLT-1 mRNA expression in granule cells in the co-cultivation treatment group at 12, 16 and 20 h, and the FLT-1 mRNA expression in COCs treatment group at 4, 8, 12, 16 and 24 h ($P < 0.01$), and extremely significantly reduce the FLT-1 mRNA expression in oocytes in the co-cultivation treatment group at 12, 20 and 24 h, and the FLT-1 mRNA expression in COCs treatment group at 4, 8 and 12 h ($P < 0.01$), but extremely significantly increase the FLT-1 mRNA expression in oocytes in the naked oocytes separate cultivation treatment group at 4-24 h ($P < 0.01$). 2) Adding VEGF could extremely significantly reduce the expression of the FLT-1 protein in granule cells in both co-cultivation treatment group and COCs cultivation treatment group at 4-12 h ($P < 0.01$). The expression of the granule cells FLT-1 protein in both naked oocytes co-cultivation treatment group and COCs cultivation treatment group showed a fluctuating downward trend. The granule cells FLT-1 protein expression in both COCs cultivation control group and COCs cultivation treatment group were higher than that of granule cells with naked oocytes co-cultivation treatment group at all time points. 3) Among the 3 *in vitro* maturation culture methods, except for a sharp increase in the naked oocytes separate cultivation control group at 20-24 h, the oocytes FLT-1 protein expression in the other groups showed a downward trend of fluctuation. In conclusion, the FLT-1 has autocrine and paracrine effects in oocytes and granule cells. The expression of the FLT-1 mRNA and protein in oocyte are closely related to the presence or absence of peripheral granule cells, the number and the way of encapsulation. During *in vitro* culture environment, the addition of VEGF can effectively activate the FLT-1 mRNA expression, but at the same time combine the FLT-1 protein in order to play a biological effect promoting oocytes maturation, thus reducing the FLT-1 protein expression.

Key words: ovine; oocytes; VEGF; FLT-1

Senger 等^[1]和 Sirois 和 Edelman^[2]在豚鼠、仓鼠和小鼠中发现血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),是一种具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用的高度特异性生长因子,当血液循环不足,如在缺氧条件下,是将氧气供应恢复到组织中系统的一部分^[3]。多集中于小鼠、大鼠和人医学研究,而关于绵羊方面的研究报道很少^[4-16]。血管内皮生长因子受体 1(fms-like tyrosine kinase-1, FLT-1)是 VEGF 的受体^[17]。Terman 等^[18]证实,血管内皮生长因子受体 2(kinase insert domain receptor, KDR)亦是 VEGF 的受体。除了与 VEGF 受体结合外,VEGF 还与由神经皮素(neuropilins, NRP)和 VEGF 受体组成的受体复合物结合,这种受体复合物能增加 VEGF 信号活

性^[19-20]。而 NRP 是种优势多形性受体,因此其他分子可能干扰 NRP/VEGFR 受体复合物的信号。例如,第 3 类信号素与 VEGF165 竞争 NRP 结合,从而调节 VEGF 介导的血管生成^[21]。本课题组的前期研究发现,VEGF 在绵羊卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocytes complexes, COCs)体外成熟过程中同时促进卵母细胞核成熟和细胞质成熟,以提供高质量的成熟卵母细胞^[22-25]。VEGF 是通过存在于卵母细胞和颗粒细胞中的两个受体 FLT-1 和 KDR 相结合而发挥其生物学作用^[26]。本研究是对前期研究的持续,属于系列研究。本试验针对 3 种不同卵母细胞体外培养方式下,外源添加 VEGF 作为试验组,未添加 VEGF 作为对照组,利用 qPCR 和 Western blot 测定不同培养时间 FLT-1 mRNA 和蛋白分别在绵羊卵母细胞和颗粒细胞中表达变

化。首次探究绵羊卵母细胞不同体外成熟培养方式下, VEGF 对 FLT-1 分别在卵母细胞和颗粒细胞中的表达变化和具体影响, 为后期明确 VEGF 在绵羊卵母细胞体外成熟和胚胎发育中的作用机制及路径研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 绵羊卵巢采集

新疆石河子市牛羊定点屠宰场屠宰的母绵羊, 无菌手术剪下双侧卵巢, 保存于 25~30 °C 生理盐水中, 3~4 h 内带回实验室^[27]。

1.2 3 种不同培养方式及试验分组

采用剖切法采集卵母细胞, 选取 A、B 级 COCs, 成熟液中清洗数遍后备用^[27]。3 种不同的体外成熟培养方式: ①用移液器吹打 COCs 使颗粒细胞与卵母细胞分离, 用口吸管将卵母细胞吸出, 作为裸卵单独培养; ②用移液器吹打 COCs 使颗粒细胞与卵母细胞分离, 用口吸管将卵母细胞吸出备用, 将含有颗粒细胞的成熟液 2 500 r · min⁻¹ 离心 5 min, 将颗粒细胞转移至培养皿中, 随即将之前准备好的裸露卵母细胞转移至颗粒细胞上, 作为颗粒细胞与裸卵共培养; ③COCs 直接转移至培养皿中, 作为 COCs 培养。3 种不同培养方式中, 所有试验组添加 5 ng · mL⁻¹ VEGF, 对照组则不添加。5 ng · mL⁻¹ VEGF 添加剂量根据前期研究结果确定^[22-23]。

1.3 RNA 提取与 cDNA 合成

用试剂盒对颗粒细胞和卵母细胞进行 RNA 提取并反转录成 cDNA^[27]。

1.4 实时定量 PCR

根据 NCBI 提供的 mRNA 序列, 采用 Primer premier 5.0 设计引物。FLT-1(114 bp) 上游引物: 5'-TGGCACAAAGACCCAAAAGA-3'; 下游引物: 5'-GGCGTTGAGCGGAATGTAG-3'。GAPDH(119 bp) 上游引物: 5'-CCTGCCAAGTATGATGAGAT-3'; 下游引物: 5'-TGAGTGTCTGCTGTTGAAGT-3'。其中 GAPDH 为内参。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

采用 480 II qPCR 仪进行实时定量 PCR 扩增, 退火温度为 60 °C^[27]。mRNA 相对表达量采用 2^{-ΔCT} 进行计算。

1.5 Western blot 检测

采用湿转法对处理过的蛋白质样品经电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育后, 用 ECL 对含有目

的蛋白的 PVDF 膜处理后, 用 X 光曝光, 再用相关软件进行分析^[27]。

1.6 数据分析

试验数据采用 Excel 2016 及 SPSS 22.0 进行统计分析, $P < 0.01$ 表示差异极显著; $P > 0.05$ 表示差异不显著。Origin 2018 作图。

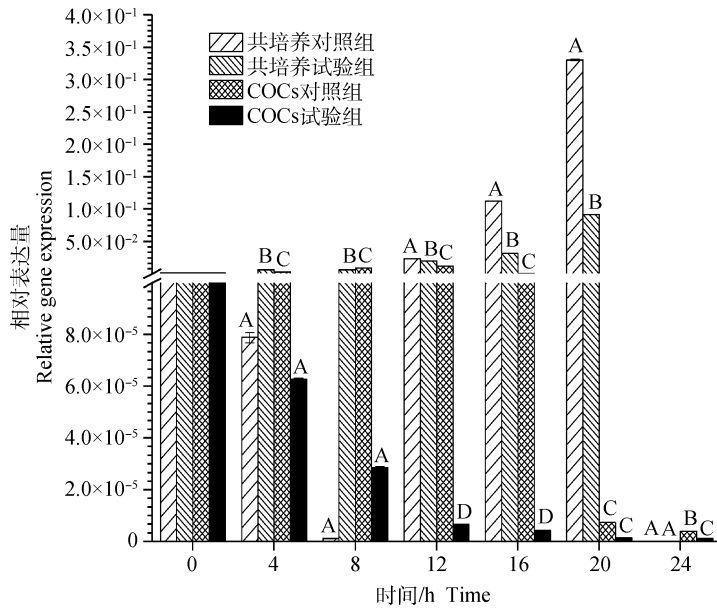
2 结果

2.1 不同培养方式下外源添加 VEGF 对颗粒细胞 FLT-1 mRNA 表达的影响

图 1 结果表明, 在共培养及 COCs 培养两种方式下, 除颗粒细胞与裸卵共培养方式中未能在 24 h 检测到颗粒细胞 FLT-1 mRNA 表达外, 其余不同培养时间下的试验组和对照组的颗粒细胞中均有 FLT-1 mRNA 表达。两种不同培养方式中, 共培养对照组中颗粒细胞的 FLT-1 mRNA 表达量呈先降后升再降, 0~8 h 下降, 8~20 h 上升, 其中 16~20 h 上升速率最快, 在 20 h 时最高 ($3.31 \times 10^{-1} \pm 1.32 \times 10^{-3}$), 20~24 h 急速下降至 0; 共培养试验组中颗粒细胞的 FLT-1 mRNA 表达量从 0~4 h 开始上升, 4~8 h 略有下降, 8~20 h 又开始上升至最高 ($9.21 \times 10^{-2} \pm 6.39 \times 10^{-4}$), 20~24 h 急速下降至 0; COCs 对照组中颗粒细胞的 FLT-1 mRNA 表达量从 0~12 h 开始急速上升至最高 ($1.26 \times 10^{-2} \pm 1.01 \times 10^{-4}$), 12~24 h 开始下降, 其中 16~20 h 降速最快; COCs 试验组中颗粒细胞的 FLT-1 mRNA 表达量在 0~4 h 阶段急速下降, 4~24 h 平稳下降至 24 h 最低 ($1.13 \times 10^{-6} \pm 1.20 \times 10^{-8}$)。12 和 16 h 各组间颗粒细胞的 FLT-1 mRNA 表达量差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.2 不同培养方式下外源添加 VEGF 对卵母细胞 FLT-1 mRNA 表达的影响

图 2 结果表明, 3 种不同培养方式下, 卵母细胞中均有 FLT-1 mRNA 表达。裸卵对照组中卵母细胞的 FLT-1 mRNA 表达量在 0~24 h 呈先降后升, 在 12 h 降至最低 ($1.18 \times 10^{-2} \pm 4.72 \times 10^{-5}$), 24 h 最高 ($2.14 \times 10^{-2} \pm 2.27 \times 10^{-4}$); 裸卵试验组中卵母细胞的 FLT-1 mRNA 表达量呈先升后降趋势, 其中 20 h 升至最高 ($7.97 \times 10^{-2} \pm 9.60 \times 10^{-4}$); 共培养对照组中卵母细胞的 FLT-1 mRNA 表达量总体呈上升趋势, 其中 16~24 h 上升较快, 尤其是 20~24 h 上升速率最大, 24 h 表达量最高 ($6.16 \times 10^{-2} \pm 8.55 \times 10^{-4}$); 共培养试验组中卵母细胞的



标注相同大写字母表示培养相同时间各组间差异不显著 ($P > 0.05$), 标注不同大写字母表示培养相同时间各组间差异极显著 ($P < 0.01$)。下同

The same capital letters indicate no significant difference in same culture time among different groups ($P > 0.05$); The different capital letters indicate extremely significant differences in same culture time among different groups ($P < 0.01$). The same as below

图 1 不同培养方式下颗粒细胞 FLT-1 mRNA 表达水平

Fig. 1 FLT-1 mRNA expression level in granule cells in different culture ways

FLT-1 mRNA 表达量在 0~20 h 总体呈波动性上升趋势, 20~24 h 急速上升至最高 ($4.26 \times 10^{-2} \pm 3.42 \times 10^{-4}$); COCs 不论是对照组还是试验组中卵母细胞的 FLT-1 mRNA 表达量均呈下降趋势, 其中 0~8 h 下降较快, 尤其是 0~4 h 下降速率最大,

在 24 h 表达量最低, 对照组 ($4.18 \times 10^{-5} \pm 3.86 \times 10^{-7}$), 试验组 ($3.21 \times 10^{-5} \pm 2.56 \times 10^{-7}$)。12 h 时各组中 FLT-1 mRNA 表达量差异极显著 ($P < 0.01$)。20 h 时裸卵试验组中的 FLT-1 mRNA 表达量为各时期各组中最高 ($7.97 \times 10^{-2} \pm 9.60 \times 10^{-4}$)。

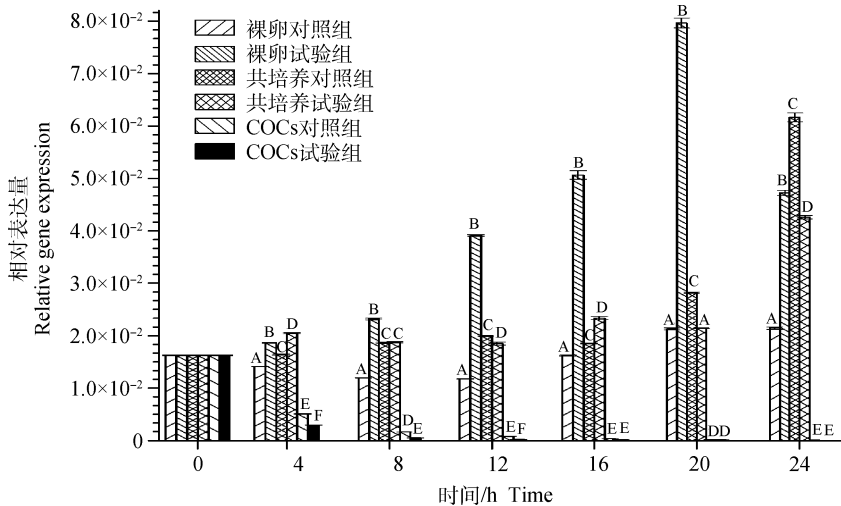
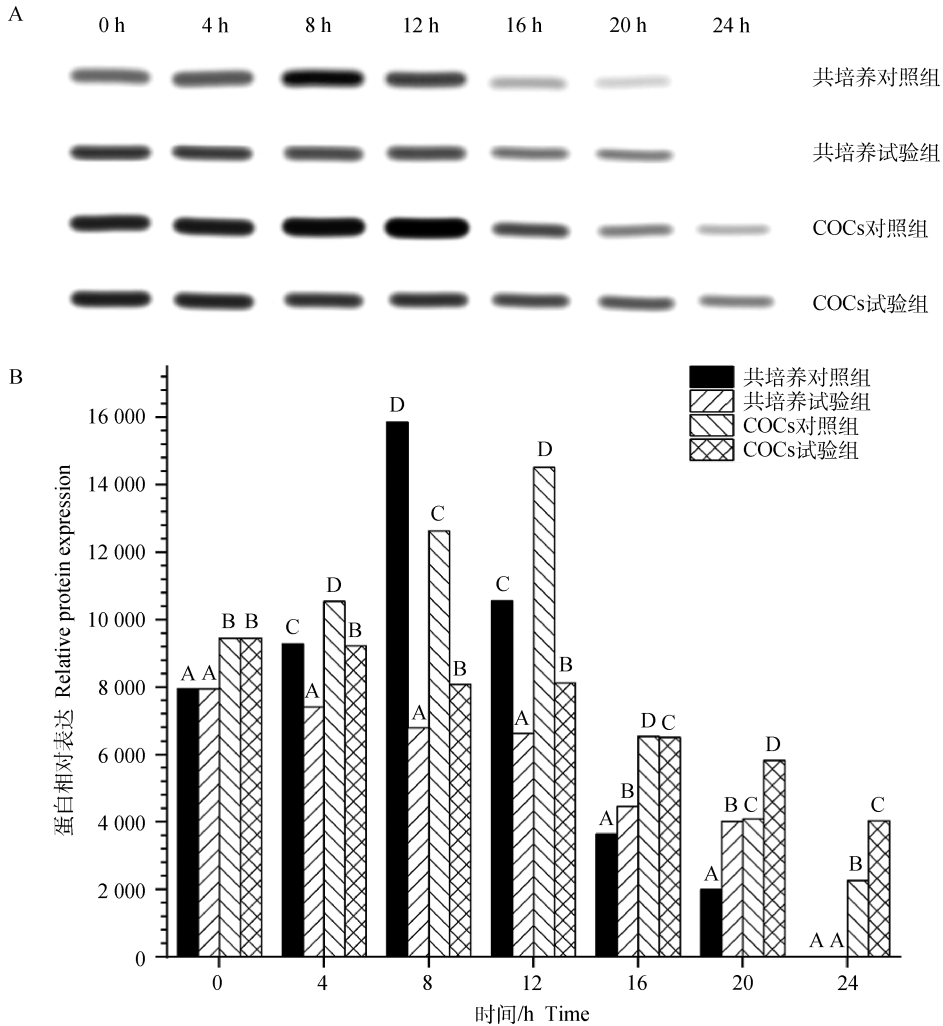


图 2 不同培养方式下卵母细胞 FLT-1 mRNA 表达水平

Fig. 2 FLT-1 mRNA expression level in oocytes in different culture ways

2.3 不同培养方式下外源添加 VEGF 对颗粒细胞 FLT-1 蛋白表达的影响

图 3 结果表明,除 24 h 在共培养对照组和试验组中未检测到颗粒细胞 FLT-1 蛋白表达外,其余各时间点不论是共培养还是 COCs 培养,颗粒细胞中均有 FLT-1 蛋白表达(图 3A)。两种不同培养方式中,共培养对照组和 COCs 对照组中颗粒细胞的 FLT-1 蛋白表达量均呈先升后降趋势,其中共培养对照组在 8 h 时最高(15 859),COCs 对照组在 12 h 最高(14 510);共培养试验组和 COCs 试验组颗粒细胞的 FLT-1 蛋白表达呈波动性下降趋势。不论是 COCs 对照组还是试验组颗粒细胞中 FLT-1 蛋白表达量在各时间点均高于同期共培养试验组(图 3B)。



A. Western blot 检测;B. 灰度值分析

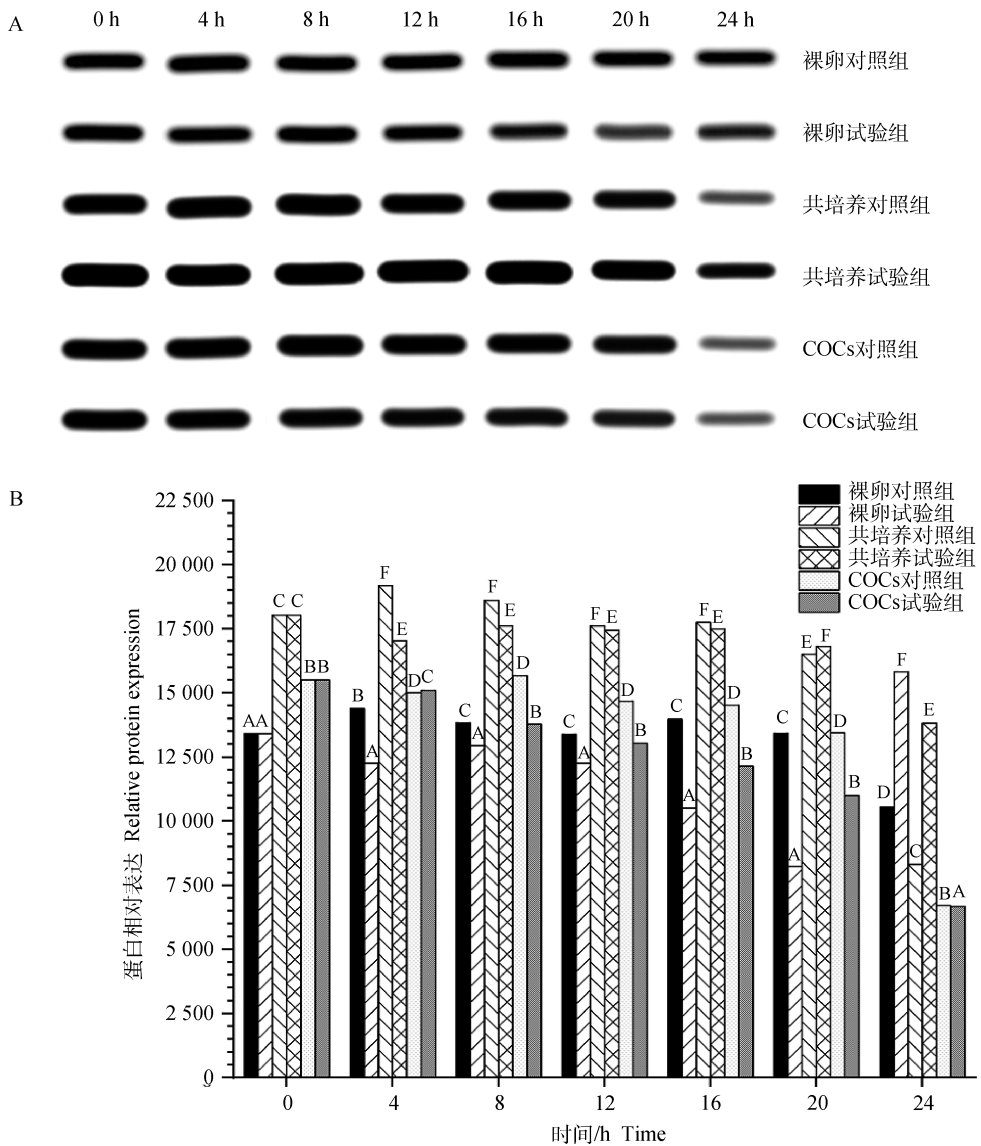
A. Western blot test; B. Grayscale analysis

图 3 不同培养方式下颗粒细胞 FLT-1 蛋白表达水平

Fig. 3 FLT-1 protein expression level in granule cells in different culture ways

2.4 不同培养方式下外源添加 VEGF 对卵母细胞 FLT-1 蛋白表达的影响

图 4 结果表明,3 种不同培养方式中,卵母细胞中均有 FLT-1 蛋白表达(图 4A)。3 种不同培养方式中,除裸卵试验组在 20~24 h 有一个急剧拉升外,其余所有组中 FLT-1 蛋白表达量总体均呈波动性下降趋势;裸卵对照组、共培养对照组、共培养试验组、COCs 对照组以及 COCs 试验组中卵母细胞 FLT-1 蛋白含量均在 24 h 检测到最低值,分别为 10 548、8 303、13 827、6 714 和 6 681;卵母细胞中 FLT-1 蛋白表达量在各组中的关系:裸卵试验组 > 共培养试验组 > 裸卵对照组 > 共培养对照组 > COCs 对照组 > COCs 试验组(图 4B)。



A. Western blot 检测; B. 灰度值分析

A. Western blot test; B. Grayscale analysis

图 4 不同培养方式下卵母细胞 FLT-1 蛋白表达水平

Fig. 4 FLT-1 protein expression level in oocytes in different culture ways

3 讨论

绵羊卵母细胞体外成熟培养过程中颗粒细胞作为营养因子的传输者,在卵母细胞成熟过程中起重要作用。而 VEGF 已经被证明能够在体外刺激细胞分裂和细胞迁移^[28-29]。本研究结果表明,FLT-1 mRNA 的表达量在绵羊卵母细胞成熟过程中并非恒定不变,在不同的时间点有不同的表达量,表达量的升降随着时间的变化贯穿培养过程始终,即在不同培养阶段表达量不同,体现出了一种阶段性; mRNA 作为一种不稳定的蛋白质信息源,很容易就

会被降解,只有当同一 mRNA 产生的速度与降解的速度相一致时,才能维持同一 mRNA 总量的不变,而本试验中,FLT-1 mRNA 的表达量在某些时间段是急剧下降的,表明在该时间段内,FLT-1 mRNA 产生的量远小于被降解的量,具有一定的时效性;在 3 种培养方式中,FLT-1 mRNA 的表达有呈下降趋势的(COCs 试验组颗粒细胞和 COCs 组卵母细胞),有呈上升趋势的(共培养组卵母细胞),有呈先降后升趋势的(裸卵对照组卵母细胞),有呈先降后升再降趋势的(共培养对照组颗粒细胞),以及先升后降趋势的(共培养试验组颗粒细胞、COCs 对照组

颗粒细胞和裸卵试验组卵母细胞),造成以上不同趋势表达的原因除了颗粒细胞与卵母细胞的不同接触方式外,还因为有外源 VEGF 的添加与否,从而导致了不同培养方式下 FLT-1 mRNA 的不同表达模式。在裸卵单独培养方式下,对照组卵母细胞 FLT-1 的 mRNA 和蛋白都有表达,说明卵母细胞中存在 FLT-1 的自分泌。FLT 基因是属于酪氨酸家族的原癌基因,与细胞生长和分化密切相关^[30],这也验证了 FLT-1 存在于卵母细胞中的合理性,但要想其能发挥生物学效应以影响卵母细胞的成熟,FLT-1 必须要与 VEGF 相结合,推断 VEGF 在卵母细胞中也存在自分泌。在体内检测了 VEGF 及其受体 FLT-1 在金黄地鼠植入前胚胎中的表达情况,发现在交配后第 3~7 天胚胎中,均检测到 VEGF 及其受体 FLT-1 蛋白的表达,并随着发育过程表现不同变化规律。另外伴随外源 VEGF 的添加在整个培养时间内 FLT-1 mRNA 表现出活跃的表达量增加(除了 24 h 外),但其蛋白水平的表达量下降(除了 24 h 外),说明在体外培养环境下外源添加 VEGF 有效的激活了 FLT-1 mRNA 表达,但同时结合 FLT-1 蛋白以促进卵母细胞成熟的生物学效应,从而减少了 FLT-1 蛋白的表达,添加 VEGF 是提高卵母细胞成熟效率的有效手段之一,这与笔者前期研究外源 VEGF 可提高卵母细胞成熟率结果相互印证。而 24 h 的 mRNA 下降和蛋白水平的提升,推断是与添加 VEGF 试验组的卵母细胞大部分已经完成了成熟过程有关,这与笔者前期研究发现 VEGF 添加试验组在 20 h 已成熟卵母细胞数量显著高于对照组结果相吻合^[26]。

3 种培养方式试验结果表明,卵母细胞中 FLT-1 mRNA 和蛋白的表达与外围颗粒细胞的存在与否、数量的多少以及包裹方式息息相关。在 COCs 组中,添加 VEGF 无论是在颗粒细胞内还是在卵母细胞内都显著降低了 4~8 h FLT-1 mRNA 和蛋白的表达。说明颗粒细胞的存在抑制或者减少了 FLT-1 的表达,也许是由于颗粒细胞的旁分泌作用抑制了 FLT-1 mRNA 的表达,但外源添加的 VEGF 有效结合了 FLT-1 导致其蛋白表达量下降。除 4~8 h 颗粒细胞 FLT-1 mRNA 外,共培养方式下的各组 FLT-1 mRNA 和蛋白表达量均显著高于 COCs 培养方式下的各组(颗粒细胞中 FLT-1 蛋白表达除外,且这两种培养方式下其表达量变化趋势相似),说明 COCs 培养方式下,VEGF 和其受体 FLT-1 作

为营养因子在颗粒细胞与卵母细胞间的互作更活跃,这也充分说明了颗粒细胞对卵母细胞成熟发育的重要作用,而 COCs 方式下,卵母细胞与颗粒细胞的接触面积远远超过共培养方式下的,这大大促进了 VEGF 和 FLT-1 的有效结合,从而令检测到的 FLT-1 mRNA 和蛋白表达量下降。在各培养方式下,未添加 VEGF 对照组 FLT-1 蛋白都在 4~8 h 左右呈现先升后降的趋势,尤其以两对对照组颗粒细胞中 FLT-1 蛋白表达结果明显,推断这与生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)的发生有关,而颗粒细胞组中的结果判断与颗粒细胞的调节作用至关重要。具有发育潜能的卵母细胞要首先获得生发泡破裂的能力,才能逐渐获得完成成熟分裂的能力,以产生高质量的、具有受精能力的卵母细胞^[31],而前期研究结果发现,添加 VEGF 有效促进了绵羊卵母细胞体外培养过程中 GVBD 的完成^[26]。外源添加 VEGF 对 4~12 h 颗粒细胞 FLT-1 蛋白表达和 20~24 h 卵母细胞 FLT-1 蛋白表达影响最明显。说明外源添加 VEGF 对 FLT-1 的影响主要发生在卵母细胞成熟前期的颗粒细胞中和卵母细胞成熟后期的卵母细胞中^[22]。表明,颗粒细胞中 FLT-1 表达对 GVBD 的完成至关重要,而卵母细胞中 FLT-1 表达对卵母细胞成熟后期的影响巨大。

本研究结果显示,添加 VEGF 能够有效稳定 FLT-1 蛋白表达波动幅度,即添加 VEGF 能够促使卵母细胞体外培养过程中 FLT-1 蛋白更稳定的表达。FLT-1 作为 VEGFA、VEGFB 和 PGF 的细胞表面受体,在胚胎血管形成、血管生成、细胞存活、细胞迁移、巨噬细胞功能、趋化、癌细胞侵袭等方面发挥着重要作用^[32]。通过抑制内皮细胞的过度增殖,可以作为胚胎血管生成的负调节因子发挥重要作用^[33]。对 VEGFA 和相对低活性蛋白激酶有很高的亲和力;可作为 VEGFA 信号的负调控因子,限制游离 VEGFA 数量,并阻止其与 KDR 结合^[34]。推测本试验卵母细胞体外成熟过程中,对照组 FLT-1 蛋白的下降跟 FLT-1 与游离 VEGF 结合有关。另一方面,一些缺乏跨膜域的亚型,如:亚型 2、亚型 3 和亚型 4,可以作为 VEGFA 的诱变受体,从 KDR 中分离 VEGF(这在胚胎的血管生成中尤为重要)^[35],通过与 KDR 形成异质二聚体来调制 KDR 信号^[36-38],KDR 蛋白在整个卵母细胞成熟过程中都有表达,在未成熟的卵母细胞和颗粒细胞的膜表面也有表达^[26],推测 FLT-1 蛋白下降跟 KDR 结合也

密不可分。配体结合导致了几个信号级联激活, PLCG 活化导致了细胞信号分子二酰基甘油和肌醇 1,4,5-三磷酸和蛋白激酶 C(PKC) 激活。外源添加 VEGF 能够令对照组中前 16 h 的 PKC 表达趋势提前 2 h, 即 PKC 在外源 VEGF 的作用下被提前激活^[26]。PKC 可介导磷脂酰肌醇 3-激酶受体 1 (phosphatidylinositol 3-kinase receptor 1, PIK3R1) 的磷酸化, 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PIK3) 亚基的调节, 导致磷脂酰肌醇激酶和下游信号通路的活化, 协调激活 MAPK1/ERK2、MAPK3/ERK1 和 MAP 激酶信号通路, 以及 AKT1 信号通路^[39-42]。笔者对绵羊卵母细胞体外成熟的研究表明, 外源添加 VEGF 提前激活 PKC 能够提高卵母细胞中 MAPK 的表达^[26], 推断 FLT-1 跨膜域亚型与 KDR 形成异质二聚体调节 KDR 信号被进一步放大, 从而导致 MAPK 信号通路被进一步激活, MAPK 表达量增加, 而 FLT-1 与 KDR 的结合也是导致 FLT-1 表达量下降的原因之一。卵母细胞中 FLT-1 蛋白表达量在 24 h 时, 卵母细胞中 FLT-1 蛋白表达量在各组中的关系: 裸卵试验组 > 共培养试验组 > 裸卵对照组 > 共培养对照组 > COCs 对照组 > COCs 试验组。

绵羊卵母细胞体外成熟培养是一个相当复杂的过程。VEGF 对绵羊卵母细胞体外培养成熟方面有着积极促进作用^[22-23, 25-26], 这种促进作用同时也影响着 FLT-1 mRNA 和蛋白在颗粒细胞和卵母细胞中的表达。其中颗粒细胞中 FLT-1 蛋白在卵母细胞成熟前期的低表达有助于卵母细胞 GVBD 的完成, 而卵母细胞中 FLT-1 蛋白稳定下降也有助于卵母细胞的成熟。本研究结果可为进一步研究绵羊卵母细胞体外成熟过程 VEGF 和其受体间的交互作用及其作用机制奠定基础。

4 结 论

卵母细胞和颗粒细胞中存在 FLT-1 的自分泌和旁分泌作用, 其表达具有阶段性、时效性和模式性; 卵母细胞中 FLT-1 mRNA 和蛋白的表达与外围颗粒细胞的存在与否、数量的多少以及包裹方式息息相关; 在体外培养环境下外源添加 VEGF 有效地激活了 FLT-1 mRNA 表达, 但同时结合 FLT-1 蛋白以促进卵母细胞成熟的生物学效应, 从而减少了 FLT-1 蛋白的表达。

参考文献 (References):

- [1] SENGER D R, GALLI S J, DVORAK A M, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid[J]. *Science*, 1983, 219(4587): 983-985.
- [2] SIROIS M G, EDELMAN E R. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor[J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(6 Pt 2): H2746-H2756.
- [3] PALMER B F, CLEGG D J. Oxygen sensing and metabolic homeostasis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 397(1-2): 51-58.
- [4] BEHL T, KOTWANI A. Exploring the various aspects of the pathological role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic retinopathy[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 99: 137-148.
- [5] WANG H Y, WANG Y S, LI D D, et al. VEGF inhibits the inflammation in spinal cord injury through activation of autophagy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(2): 453-458.
- [6] COOPER M E, VRANES D, YOUSSEF S, et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes[J]. *Diabetes*, 1999, 48(11): 2229-2239.
- [7] CAMACHO-VILLEGAS T A, MATA-GONZALEZ M T, GARCÍA-UBELOHD W, et al. Intraocular penetration of a vNAR: *in vivo* and *in vitro* VEGF₁₆₅ neutralization[J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(4): 13.
- [8] YANG C, TAHIRI H, CAI C, et al. microRNA-181a inhibits ocular neovascularization by interfering with vascular endothelial growth factor expression[J]. *Cardiovasc Ther*, 2018, 36(3): e12329.
- [9] UZUN M, GENCER M, TURKON H, et al. Effects of melatonin on blood pressure, oxidative stress and placental expressions of TNF α , IL-6, VEGF and sFlt-1 in RUPP rat model of preeclampsia[J]. *Arch Med Res*, 2017, 48(7): 592-598.
- [10] SOLEIMANI N, FARHANGI B, TAVAKOLI Y M. The effect of recombinant HopH protein of helicobacter pylori on the VEGF expression in metastatic breast cancer model [J]. *Acta Med Iran*, 2017, 55(12): 744-750.
- [11] KIM E, YANG J, PARK K W, et al. Inhibition of VEGF signaling reduces diabetes-exacerbated brain swelling, but not infarct size, in large cerebral infarc-

- tion in mice[J]. *Trans Stroke Res*, 2017, doi:10.1007/s12975-017-0601-z.
- [12] 史萌萌, 奚胜艳, 王彦晖, 等. 桃红四物汤对肝纤维化小鼠病理性血管生成相关因子 VEGF、KDR 与 Flt-1 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(2): 487-491.
SHI M M, XI S Y, WANG Y H, et al. Effects of Tao-hong Siwu Decoction on the expression of pathological angiogenesis correlation factors including VEGF, KDR and Flt-1 in hepatic fibrosis mice[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology*, 2016, 31(2): 487-491. (in Chinese)
- [13] 奥村悠斗. 电针对慢性应激抑郁大鼠海马 VEGF 表达的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
AO C Y D. The effect of electricity on the expression of VEGF in hippocampus of chronic stress depression[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2017. (in Chinese)
- [14] 焦瑞宝, 唐吉斌, 冯恒孝, 等. 男性不育患者精液中血管内皮生长因子及其受体 Flt-1 的表达研究[J]. *中国男科学杂志*, 2017, 31(1): 23-26.
JIAO R B, TANG J B, FENG H X, et al. Expressions of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in semen of male infertility[J]. *Chinese Journal of Andrology*, 2017, 31(1): 23-26. (in Chinese)
- [15] 商金艳. Endophilin A2 通过激活内皮细胞 VEGF-VEGFR2 信号和抑制 p53 细胞凋亡通路促进血管新生及机制[D]. 广州: 中山大学, 2016.
SHANG J Y. Endophilin A2 promotes angiogenesis via activating endothelial VEGF-VEGFR2 signaling and inhibiting p53 apoptosis pathway [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2016. (in Chinese)
- [16] 王东艳, 李满兰. Endoglin、VEGF 及 Flt-1 在子痫前期患者胎盘组织中的变化[J]. *热带医学杂志*, 2017, 17(3): 350-352, 413.
WANG D Y, LI M L. Endoglin, VEGF and Flt-1 in preeclampsia and placental tissue changes[J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2017, 17(3): 350-352, 413. (in Chinese)
- [17] DE VRIES C, ESCOBEDO J A, UENO H, et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor[J]. *Science*, 1992, 255(5047): 989-991.
- [18] TERMAN B I, DOUGHER-VERMAZEN M, CAR-RION M E, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 187(3): 1579-1586.
- [19] SOKER S, TAKASHIMA S, MIAO H Q, et al. Neupilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor[J]. *Cell*, 1998, 92(6): 735-745.
- [20] HERZOG B, PELLET-MANY C, BRITTON G, et al. VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407 phosphorylation[J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(15): 2766-2776.
- [21] MECOLLARI V, NIEUWENHUIS B, VERHAA-GEN J. A perspective on the role of class III semaphorin signaling in central nervous system trauma[J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 328.
- [22] CAO X, ZHOU P, LUO H L, et al. The effect of VEGF on the temporal-spatial change of α -tubulin and cortical granules of ovine oocytes matured *in vitro* [J]. *Anim Reprod Sci*, 2009, 113(1-4): 236-250.
- [23] 曹 忻, 罗海玲, 石国庆, 等. 血管内皮生长因子对绵羊卵母细胞体外受精及胚胎发育的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2008, 43(4): 27-31.
CAO X, LUO H L, SHI G Q, et al. Effects of VEGF on the ovine oocytes maturation and the early embryo development *in vitro* [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2008, 43(4): 27-31. (in Chinese)
- [24] LUO H L, KIMURA K, AOKI M, et al. Effect of vascular endothelial growth factor on maturation, fertilization and developmental competence of bovine oocytes[J]. *J Vet Med Sci*, 2002, 64(9): 803-806.
- [25] 曹 忻, 赵有璋, 罗海玲, 等. 血管内皮生长因子对体外成熟绵羊卵母细胞超微结构变化的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(2): 167-173.
CAO X, ZHAO Y Z, LUO H L, et al. Effects of VEGF on the ultrastructure of ovine oocytes cultured *in vitro* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(2): 167-173. (in Chinese)
- [26] 曹 忻. 血管内皮生长因子促进绵羊卵母细胞体外成熟机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008.
CAO X. The mechanism of vascular endothelial growth factor on promoting ovine oocyte maturation *in vitro* [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [27] 曹 忻, 邹云龙, 蔡 勇, 等. 绵羊卵母细胞体外成熟过程中 VEGF 对 DNMT3a 表达的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(3): 484-492.
CAO X, ZOU Y L, CAI Y, et al. The effects of VEGF

- on DNMT3a expression in oocytes maturation of ovine *in vitro* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(3): 484-492. (in Chinese)
- [28] LARRIVÉE B, KARSAN A. Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor (review)[J]. *Int J Mol Med*, 2000, 5(5): 447-456.
- [29] STACKER S A, VITALI A, CAESAR C, et al. A mutant form of vascular endothelial growth factor (VEGF) that lacks VEGF receptor-2 activation retains the ability to induce vascular permeability[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(49): 34884-34892.
- [30] MATSUSHIME H, YOSHIDA M C, SASAKI M, et al. A possible new member of tyrosine kinase family, human frt sequence, is highly conserved in vertebrates and located on human chromosome 13 [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1987, 78(7): 655-661.
- [31] LÉNÁRT P, ELLENBERG J. Nuclear envelope dynamics in oocytes; from germinal vesicle breakdown to mitosis[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(1): 88-95.
- [32] AUTIERO M, WALTENBERGER J, COMMUNI D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1 [J]. *Nat Med*, 2003, 9(7): 936-943.
- [33] CAI J, AHMAD S, JIANG W G, et al. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells[J]. *Diabetes*, 2003, 52(12): 2959-2968.
- [34] DUNK C, AHMED A. Vascular endothelial growth factor receptor-2-mediated mitogenesis is negatively regulated by vascular endothelial growth factor receptor-1 in tumor epithelial cells[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(1): 265-273.
- [35] ALI I, CHOUHAN V S, DANGI S S, et al. Expression and localization of locally produced growth factors regulating lymphangiogenesis during different stages of the estrous cycle in corpus luteum of buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. *Theriogenology*, 2014, 81(3): 428-436.
- [36] KENDALL R L, THOMAS K A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(22): 10705-10709.
- [37] JIN P, ZHANG J, SUMARIWALLA P F, et al. Novel splice variants derived from the receptor tyrosine kinase superfamily are potential therapeutics for rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): R73.
- [38] SELA S, ITIN A, NATANSON-YARON S, et al. A novel human-specific soluble vascular endothelial growth factor receptor 1: cell type-specific splicing and implications to vascular endothelial growth factor homeostasis and preeclampsia [J]. *Circ Res*, 2008, 102(12): 1566-1574.
- [39] SAWANO A, TAKAHASHI T, YAMAGUCHI S, et al. The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of Flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLC γ [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238(2): 487-491.
- [40] FAN F, WEY J S, MCCARTY M F, et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells [J]. *Oncogene*, 2005, 24(16): 2647-2653.
- [41] TCHAIKOVSKI V, FELLBRICH G, WALTENBERGER J. The molecular basis of VEGFR-1 signal transduction pathways in primary human monocytes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(2): 322-328.
- [42] TAYLOR A P, LEON E, GOLDENBERG D M. Placental growth factor (PlGF) enhances breast cancer cell motility by mobilising ERK1/2 phosphorylation and cytoskeletal rearrangement [J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(1): 82-89.

(编辑 程金华)